



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Ciências Aplicadas/FCA

THAMIRIS CANDREVA

**CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM CAMUNDONGOS *FAT-1*: ENVOLVIMENTO  
DA VIA ANTI-INFLAMATÓRIA COLINÉRGICA**

**WOUND HEALING IN *FAT-1* MICE: INVOLVEMENT OF THE CHOLINERGIC ANTI-  
INFLAMMATORY PATHWAY**

LIMEIRA

2017

THAMIRIS CANDREVA

**CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM CAMUNDONGOS *FAT-1*: ENVOLVIMENTO  
DA VIA ANTI-INFLAMATÓRIA COLINÉRGICA**

**WOUND HEALING IN *FAT-1* MICE: INVOLVEMENT OF THE CHOLINERGIC ANTI-  
INFLAMMATORY PATHWAY**

*Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo da Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo, na Área de Nutrição.*

*Orientadora:* PROF<sup>a</sup>. DRA. HOSANA GOMES RODRIGUES

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA THAMIRIS  
CANDREVA, E ORIENTADA PELA  
PROFA. DRA. HOSANA GOMES  
RODRIGUES

LIMEIRA

2017

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2016/02021-3

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas  
Renata Eleuterio da Silva - CRB 8/9281

C161c Candreva, Thamiris, 1992-  
Cicatrização de feridas em camundongos FAT-1 : envolvimento da via anti-inflamatória colinérgica / Thamiris Candreva. – Limeira, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Hosana Gomes Rodrigues.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Cicatrização. 2. Inflamação. 3. Ômega-3. 4. Via anti-inflamatória colinérgica. I. Rodrigues, Hosana Gomes, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Wound healing in FAT-1 mice : involvement of the cholinergic anti-inflammatory pathway

**Palavras-chave em inglês:**

Healing

Inflammation

Omega-3

Cholinergic anti-inflammatory pathway

**Área de concentração:** Nutrição

**Titulação:** Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

**Banca examinadora:**

Hosana Gomes Rodrigues [Orientador]

Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro

Eliana Pereira de Araujo

**Data de defesa:** 17-11-2017

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Data da defesa:** 17/11/2017

**Titulação:** Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo, na Área de Nutrição.

**Comissão examinadora:**

Profa. Dra. Hosana Gomes Rodrigues – Presidente

Profa. Dra Maria Cláudia Gonçalves de Oliveira Fusaro

Profa. Dra. Eliana Pereira de Araujo

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca, encontra-se no processo de vida acadêmica da aluna Thamiris Candreva.

## DEDICATÓRIA

*Ao homem da minha vida, meu noivo Bruno, pelo apoio incondicional em todos os momentos.*

*Sem você nenhuma conquista valeria a pena.*

*Aos meus pais Rudimar e Cecília e ao meu irmão Ronny, pela demonstração diária e imensurável de amor e por me ensinarem o caminho da persistência e honestidade.*

## AGRADECIMENTOS

*À Deus pelo dom da vida, pela saúde e proteção.*

*À minha orientadora Hosana, pela oportunidade de conhecer e trabalhar na área acadêmica e científica e por dedicar-se integralmente a minha vida profissional. Deixo aqui, meu respeito e admiração pela professora e orientadora que é e a qual me inspira a cada dia.*

*Ao Professor Marco Aurélio, pela co-orientação no início da minha vida científica. Seus ensinamentos foram os melhores que alguém poderia ter e me tornaram a profissional que me orgulho de ser hoje.*

*Ao Professor Danilo, pelo incentivo a área científica e por me apresentar à Professora Hosana e ao Professor Marco Aurélio. Obrigada pelos ensinamentos e por todos os dias que me levou a noite à faculdade em Jaguariúna, para que eu pudesse desenvolver meu projeto durante o dia na UNICAMP. Sem você, seria impossível seguir este caminho.*

*Ao meu laboratório LabNutre, pelo respeito, amizade, cumplicidade e confiança. Agradeço imensamente a todos, pelo trabalho impecável realizado e por toda a ajuda quando precisei. Esta conquista também é de vocês.*

*Ao laboratório de Imunoinflamação, pelas amizades eternas que fiz, pelo suporte e toda ajuda que recebi, para que eu pudesse realizar meus experimentos e evoluir profissionalmente.*

*Ao Professor Jing X. Kang, por nos permitir utilizar os camundongos FAT-1 como objeto de estudo em meu projeto e contribuir grandiosamente para a pesquisa do meu laboratório.*

*Ao Professor Rui Curi e seu grupo de trabalho, pelos cuidados com os camundongos FAT-1 e por toda ajuda e suporte com experimentos, análises e discussões enriquecedoras.*

*Ao laboratório LabDime, em especial aos Professores Márcio e Adriana e à aluna Suleyma, pelas significativas discussões e suporte de espaço e materiais, para a realização de experimentos.*

*Ao Professor Philip Calder, pela oportunidade de realizar um estágio de pesquisa no exterior e engrandecer minha vida profissionalmente. Obrigada pela recepção, orientação e carinho durante toda minha estadia*

*Ao Instituto de Ciências do Desenvolvimento da Universidade de Southampton-UK e em especial ao grupo do Professor Philip Calder, pela atenção, hospitalidade e principalmente pelos ensinamentos e ajuda com os experimentos e análises.*

*Ao meu noivo Bruno, pelo amor, paciência e incentivo nos momentos de fraqueza. Não existem palavras que descrevam minha gratidão por ter você em minha vida. Obrigada por caminhar comigo e jamais permitir que eu deixe de viver uma oportunidade. Você é meu sucesso.*

*Aos meus pais Rudimar e Cecília e ao meu irmão Ronny, por serem minha base de amor e felicidade e meu refúgio nos momentos difíceis. Obrigada pela paciência, pelos conselhos e por me ensinarem com dignidade a lutar pelos objetivos e, que nada neste mundo, é maior e mais importante do que a família.*

*À minha amiga e irmã de alma Carolina, um presente que o mestrado me deu, por ter deixado o meu trabalho mais leve e minha vida mais feliz. Obrigada pela ajuda, pelas palavras nos momentos de incerteza, por me cativar e inspirar com sua determinação e pelo ser humano que é.*

*Aos meus amigos, por me ouvirem e me aconselharem quando precisei e pelos momentos de descontração que revitalizam a alma e nos dão força para continuarmos e darmos nosso melhor.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela contribuição financeira para que meu projeto pudesse ser desenvolvido com qualidade. Agradeço juntamente, as demais agências de fomento: CAPES, CNPq e FAPEX, pela contribuição financeira com todo o meu grupo de pesquisa.*

***"Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante"***

***(Antoine de Saint-Exupéry)***

## RESUMO

A inflamação é a primeira fase do processo de cicatrização de feridas e esta pode ser dividida em resposta inflamatória inicial e tardia. A resposta inflamatória tardia é essencial ao controle de mediadores pró-inflamatórios e resolução da inflamação, sendo determinante ao início da próxima fase de formação de tecido ou proliferação. Ácidos graxos poli-insaturados das famílias  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3, modulam o perfil inflamatório, sendo cada vez mais estudados no processo de reparo tecidual. Assim, buscando compreender o papel destes ácidos graxos na fase inflamatória tardia do processo de cicatrização de feridas, utilizamos como objeto de estudo, camundongos transgênicos denominados *FAT-1*, capazes de produzir endogenamente, ácidos graxos  $\omega$ -3 a partir de ácidos graxos  $\omega$ -6. Para verificar a composição lipídica destes camundongos, avaliamos por cromatografia gasosa, o plasma e o tecido cicatricial, 3 dias após a indução da ferida. No plasma, os camundongos transgênicos reduziram a concentração do ácido graxo araquidônico (AA) e aumentaram a concentração dos ácidos graxos alfa-linolênico (ALA), eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), reduzindo a proporção  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 em 32,9%, quando comparados ao grupo *wild type* (WT). Já no tecido cicatricial, estes camundongos apresentaram redução da porcentagem de AA nas classes lipídicas teciduais de fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletalona (PE) e, aumento dos ácidos graxos docosapentaenóico (DPA) e DHA nas classes lipídicas teciduais de PC, PE e de triacilglicerol (TAG). Com isto, os camundongos transgênicos obtiveram uma redução da proporção  $\omega$ -6/ $\omega$ -3, equivalente a 56,4% em PC, 55,1% em PE e 39,1% em TAG, em relação ao grupo WT. Em análise do fechamento da ferida pelo programa *Image J*, os camundongos *FAT-1* mantiveram a área da ferida maior desde o 1º dia após a indução, sendo que no último dia de análise (14º dia), a área da ferida era duas vezes maior que a do grupo WT ( $p < 0.01$ ). Na análise da atividade da mieloperoxidase (MPO) por espectrofotometria, os camundongos transgênicos exibiram aumento da atividade no tecido cicatricial de 3 dias, quando comparados ao grupo WT ( $p < 0.05$ ). Considerando este mesmo tempo de ferida para todas as demais análises, observamos através de PCR em tempo real, que os camundongos *FAT-1* aumentaram a expressão gênica dos marcadores celulares CD206 e CD280 ( $p < 0.05$ ), representativos de macrófagos M2. Contudo, pelo método de ELISA, verificou-se que estes camundongos aumentaram a produção dos mediadores: IL-6 ( $p < 0.05$ ), CXCL1 ( $p < 0.05$ ), CXCL2 ( $p < 0.01$ ), TIMP-1 ( $p < 0.01$ ) e VEGF ( $p < 0.05$ ) e reduziram IL-10 ( $p < 0.05$ ), indicando uma modulação da resposta inflamatória tardia. Buscando investigar se a via anti-inflamatória colinérgica estaria influenciando esta resposta, analisamos a produção de acetilcolina (ACh) e



colina livre pelo método colorimétrico, a atividade da acetilcolinesterase (AChE) por espectrofotometria e a expressão das proteínas  $\alpha 7$ nAChR, STAT3 e pSTAT3, por *western blotting*. Os camundongos *FAT-1*, aumentaram a expressão proteica da  $\alpha 7$ nAChR ( $p < 0.001$ ) e reduziram pSTAT3 ( $p < 0.05$ ), exibindo um comprometimento da propagação do sinal anti-inflamatório, no ambiente intracelular. Para analisar o impacto desta inflamação tardia exacerbada, analisamos por PCR *array*, a expressão de genes presentes em todo o processo de cicatrização de feridas. No grupo *FAT-1*, genes essenciais à formação e manutenção da matriz extracelular (MEC) foram negativamente modulados. Assim, concluímos que o não controle da resposta inflamatória tardia pelos camundongos *FAT-1*, pode ter prejudicado as funções da MEC e contribuído para o atraso no reparo tecidual.

## ABSTRACT

Inflammation is the first stage of the wound healing process and can be divided into initial and late inflammatory response. The late inflammatory response is essential for the control of pro-inflammatory mediators and resolution of inflammation, and is decisive at the beginning of the next phase of tissue formation or proliferation. Polyunsaturated fatty acids of  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 families, modulate the inflammatory profile, being increasingly studied in the tissue repair process. Thus, to understand the role of these fatty acids in the late inflammatory phase of the wound healing process, we used *FAT-1* transgenic mice capable of endogenously producing  $\omega$ -3 fatty acids from  $\omega$ -6. To verify the lipid composition of these mice, we evaluated by gas chromatography, plasma and scar tissue 3 days after wound induction. In the plasma, transgenic mice reduced arachidonic acid (AA) concentration and increased the concentration of alpha-linolenic acid (ALA), eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) fatty acids, reducing the  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ratio in 32,9%, when compared to the wild type (WT) group. In the scar tissue, these mice had a reduction in the percentage of AA in the lipidic tissue classes of phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylalmonamine (PE) and, increase in the fatty acids docosapentaenoic acid (DPA) and DHA in the lipidic tissue classes of PC, PE and triacylglycerol (TAG). Thus, the transgenic mice obtained a reduction of  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ratio, equivalent to 56,4% in PC, 55,1% in PE and 39,1% in TAG, in relation to the WT group. In the analysis of wound closure by the Image J program, *FAT-1* mice maintained the major wound area from the 1<sup>st</sup> day after induction, and on the last day of analysis (14<sup>th</sup> day), the area of the wound was two times greater than that of the WT group ( $p < 0.01$ ). In the analysis of myeloperoxidase activity (MPO) by spectrophotometry, the transgenic mice showed increased activity in the cicatricial tissue of 3 days, when compared to the WT group ( $p < 0.05$ ). Considering this same time of wound for all other analyzes, we observed through PCR real time, that *FAT-1* mice increased the gene expression of CD206 and CD280 cell markers ( $p < 0.05$ ), representative of M2 macrophages. However, by the ELISA method, these mice were found to increase the production of mediators: IL-6 ( $p < 0.05$ ), CXCL1 ( $p < 0.05$ ), CXCL2 ( $p < 0.01$ ), TIMP-1 ( $p < 0.01$ ) and VEGF ( $p < 0.05$ ) and reduced IL-10 ( $p < 0.05$ ), indicating a modulation of the late inflammatory response. In order, to investigate whether the cholinergic anti-inflammatory pathway was influencing this response, we analyzed the production of acetylcholine (ACh) and free choline by colorimetric method, acetylcholinesterase activity (AChE) by spectrophotometry and expression of  $\alpha 7$ nAChR, STAT3 and pSTAT3 proteins, by western blotting. *FAT-1* mice increased the protein

expression of  $\alpha 7$ nAChR ( $p < 0.001$ ) and reduced pSTAT3 ( $p < 0.05$ ), exhibiting impairment of the propagation of the anti-inflammatory signal, in the intracellular environment. To analyze the impact of this late inflammation exacerbated, we analyzed by PCR array, the expression of genes present throughout the wound healing process. In *FAT-1* group, genes essential for the formation and maintenance of the extracellular matrix (ECM) were negatively modulated. Thus, we concluded that the non-control of the late inflammatory response by the *FAT-1* mice, may have impaired the ECM functions and contributed to delayed tissue repair.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E ANEXOS

Figura 1. Fases do processo de cicatrização de feridas.....	23
Figura 2. Conversão de ácidos graxos $\omega$ -6 em $\omega$ -3 pelo gene <i>fat-1</i> .....	28
Figura 3. Via anti-inflamatória colinérgica.....	30
Figura 4. Procedimento de genotipagem.....	35
Figura 5. Indução da ferida dorsal.....	36
Figura 6. Homogeneização do tecido.....	37
Figura 7. Cromatografia gasosa.....	38
Figura 8. Método ELISA.....	41
Figura 9. <i>Array layout</i> .....	41
Figura 10. Genotipagem.....	47
Figura 11. Composição lipídica do plasma, do tecido não cicatricial e cicatricial de 3 dias.....	49
Figura 11A. Concentração de ácidos graxos $\omega$ -6 e $\omega$ -3 e a proporção $\omega$ -6/ $\omega$ -3, no plasma.....	49
Figura 11B. Porcentagem de ácidos graxos $\omega$ -6 e $\omega$ -3 e a proporção $\omega$ -6/ $\omega$ -3, na classe lipídica tecidual de PC.....	50
Figura 11C. Porcentagem de ácidos graxos $\omega$ -6 e $\omega$ -3 e a proporção $\omega$ -6/ $\omega$ -3, na classe lipídica tecidual de PE.....	50
Figura 11D. Porcentagem de ácidos graxos $\omega$ -6 e $\omega$ -3 e a proporção $\omega$ -6/ $\omega$ -3, na classe lipídica tecidual de TAG.....	51
Figura 11E. Análise temporal da porcentagem de ácidos graxos $\omega$ -6 e $\omega$ -3 e a proporção $\omega$ -6/ $\omega$ -3, na classe lipídica tecidual de PC.....	52
Figura 11F. Análise temporal da porcentagem de ácidos graxos $\omega$ -6 e $\omega$ -3 e a proporção $\omega$ -6/ $\omega$ -3, na classe lipídica tecidual de PE.....	53

Figura 11G. Análise temporal da porcentagem de ácidos graxos $\omega$ -6 e $\omega$ -3 e a proporção $\omega$ -6/ $\omega$ -3, na classe lipídica tecidual de TAG.....	54
Figura 12. Fechamento da ferida.....	55
Figura 12A. Análise quantitativa do fechamento da ferida.....	55
Figura 12B. Figura representativa do fechamento da ferida.....	56
Figura 13. Atividade enzimática da MPO.....	57
Figura 14. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real.....	58
Figura 14A. Expressão do gene escolhido para controle interno ( <i>Housekeeping</i> ).....	58
Figura 14B. Expressão gênica de marcadores celulares.....	59
Figura 15. Quantificação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento.....	61
Figura 15A. Quantificação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no tecido não cicatricial.....	61
Figura 15B. Quantificação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no tecido cicatricial de 3 dias.....	62
Figura 15C. Comparação da produção de mediadores inflamatórios no tecido não cicatricial e cicatricial de 3 dias de cada grupo.....	63
Figura 16. PCR- <i>array</i> específico para cicatrização de feridas.....	65
Figura 17. Quantificação de ACh e colina livre.....	66
Figura 18. Atividade enzimática da AChE.....	67
Figura 19. Análise da expressão proteica da $\alpha$ 7nAChR, STAT3 total e pSTAT3.....	68
Figura 19A. Análise da expressão proteica da $\alpha$ 7nAChR.....	68
Figura 19B. Análise da expressão proteica da STAT3 total.....	68
Figura 19C. Análise da expressão proteica da pSTAT3.....	68
Figura 19D. Bandas totais reveladas.....	69

<b>Anexo 1. Comitê de Ética .....</b>	<b>83</b>
<b>Anexo 2. Carta de submissão de artigo científico.....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1. Sequência dos primers sense e anti sense dos marcadores celulares.....40**

**Tabela 2. Descrição dos genes para *PCR array*.....42**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

19H-PGF1 $\alpha$ : Ácido 19R-tetrahidroxi-13E-prostaenóico

20H-PGF2 $\alpha$ : Ácido 20-tetra-hidroxi-5Z, 13E-prostadienóico

AA: Ácido araquidônico

Acetil-coA: Acetil-coenzima A

ACh: Acetilcolina

AChE: Acetilcolinesterase

ALA: Ácido alfa-linolênico

Angp1: Angiopoetina 1

BHT: Butil hidroxi tolueno

C. elegans: *Caenorhabditis elegans*

Ccl12: Ligante 12 de quimiocina

CE: Ésteres de colesterol

Col14a1: Colágeno tipo XIV, alfa-1

Col4a3: Colágeno tipo IV, alfa-3

Col5a3: Colágeno tipo V, alfa-3

CSF2: Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

CXCL1: Ligante 1 de quimiocina CXC

CXCL2: Ligante 2 de quimiocina CXC

DAMPs: Padrões moleculares associados a danos

DHA: Ácido docosahexaenóico

DIMS: Dietas imunomoduladoras

DPA: Ácido docosapentaenóico



EGFR: Receptor do fator de crescimento epidérmico

EPA: Ácido eicosapentaenóico

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FGF: Fator de crescimento de fibroblastos

GLA: Ácido gama linolênico

HB-EGF: Fator de crescimento epidérmico ligado a heparina

HTAB: Hexadeciltrimetilamônio

ICAM: Moléculas de adesão intercelular

IFN $\gamma$ : Interferon- $\gamma$

IL-10: Interleucina-10

IL-12: Interleucina-12

IL-13: Interleucina-13

IL-1 $\beta$ : Interleucina-1 beta

IL-23: Interleucina-23

IL-4: Interleucina-4

IL-6: Interleucina-6

Itga1: Integrina alfa-1

Itga2: Integrina alfa-2

Itga4: Integrina alfa-4

Itgb3: Integrina beta-3

Itgb5: Integrina beta-5

Itgb6: Integrina beta-6

JAK2: Janus tirosina-quinase 2

LA: Ácido linolênico

LPS: Lipopolissacarídeo

MAPK: Proteínas quinases ativadas por mitógenos

MEC: Matriz extracelular

MMP1a: Metaloproteinase de matriz 1a

MMPs: Metaloproteinases

MPO: Mieloperoxidase

MTBE: Metil-eter-butil

NEFA: Ácidos graxos não estereificados

NF- $\kappa$ B: Fator nuclear kappa-B

NTS: Núcleo do trato solitário

PB: Pares de base

PC: Fosfatidilcolina

PCR: Reação em cadeia de polimerase

PE: Fosfatidiletanolamina

PGF1 $\alpha$ : Prostaglandina F1 $\alpha$

PGF2 $\alpha$ : Prostaglandina F2 $\alpha$

Plaur: Receptor do ativador de plasminogênio tipo uruquinase

pSTAT3: Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 fosforilado

RvD1: Resolvina D1

Serpine: Inibidor de serina (ou cisteína) proteinase, clade E, membro 1

SNC: Sistema nervoso central

SPE: Extração em fase sólida

STAT3: Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

TAG: Triacilglicerol

TGF- $\beta$ : Fator de crescimento transformante beta

TIMP-1: Inibidor de metaloproteinase-1

TIMPs: Inibidores de metaloproteinases

TLR: Receptores *toll like*

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa

VACHT: Transportador vesicular de acetilcolina

VCAM: Moléculas de adesão celular vascular

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

Wnt5a: Membro 5a da família do sítio de integração *Wingless-type* MMTV

WT: *Wild type*

$\alpha 7$ nAChR: Subunidade  $\alpha$ -7 do receptor nicotínico de acetilcolina

$\omega$ -3: Ômega-3

$\omega$ -6: Ômega-6

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>1.1. Processo de cicatrização de feridas.....</b>	<b>23</b>
<b>1.2. Ácidos graxos poli-insaturados e cicatrização de feridas.....</b>	<b>26</b>
<b>1.3. Camundongos <i>FAT-1</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>1.4. Mecanismo neuroimunológico e cicatrização de feridas.....</b>	<b>28</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO PRESENTE TRABALHO.....</b>	<b>31</b>
<b>2.1. Justificativa do presente trabalho.....</b>	<b>31</b>
<b>2.2. Hipótese do presente trabalho.....</b>	<b>31</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1. Objetivo geral.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>33</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1. Animais e tratamento.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2. Genotipagem.....</b>	<b>34</b>
<b>4.3. Indução das feridas e análise macroscópica do fechamento da ferida.....</b>	<b>35</b>
<b>4.4. Homogeneização do tecido cicatricial.....</b>	<b>36</b>
<b>4.5. Análise da composição lipídica do plasma, do tecido não cicatricial e cicatricial de 3 dias por cromatografia gasosa.....</b>	<b>37</b>
<b>4.6. Análise da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) no tecido cicatricial de 1, 3, 5 e 12 dias.....</b>	<b>38</b>
<b>4.7. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real no tecido não cicatricial e cicatricial de 3 dias.....</b>	<b>39</b>

4.8. Quantificação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no tecido não cicatricial e cicatricial de 3 dias.....	40
4.9. Análise da expressão gênica por PCR- <i>array</i> específico para cicatrização de feridas no tecido cicatricial de 3 dias.....	41
4.10. Quantificação de ACh e colina livre no tecido cicatricial de 3 dias.....	44
4.11. Análise da atividade enzimática da AChE no tecido cicatricial de 3 dias.....	44
4.12. Análise da expressão proteica da $\alpha 7$ nAChR, STAT3 total e pSTAT3 ( <i>Western blotting</i> ) no tecido cicatricial de 3 dias.....	44
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
6. RESULTADOS.....	47
6.1. Genotipagem de camundongos <i>C57black/6</i> e <i>FAT-1</i> .....	47
6.2. Camundongos <i>FAT-1</i> reduziram a incorporação de AA e aumentaram a incorporação de ácidos graxos $\omega$ -3 no plasma e no tecido cicatricial de 3 dias.....	47
6.3. Camundongos <i>FAT-1</i> apresentaram atraso no fechamento da ferida.....	55
6.4. Camundongos <i>FAT-1</i> aumentaram a atividade enzimática da MPO no tecido cicatricial de 3 dias.....	56
6.5. Camundongos <i>FAT-1</i> aumentaram a expressão gênica dos marcadores celulares CD206 e CD280.....	57
6.6. Camundongos <i>FAT-1</i> aumentaram a produção de mediadores pró-inflamatórios e reduziram a concentração de importante citocina anti-inflamatória.....	60
6.7. Camundongos <i>FAT-1</i> alteraram a expressão de genes envolvidos no processo de cicatrização de feridas.....	64
6.8. Camundongos <i>FAT-1</i> não alteraram a produção de ACh e colina livre.....	65
6.9. Camundongos <i>FAT-1</i> não alteraram a atividade enzimática da AChE.....	66

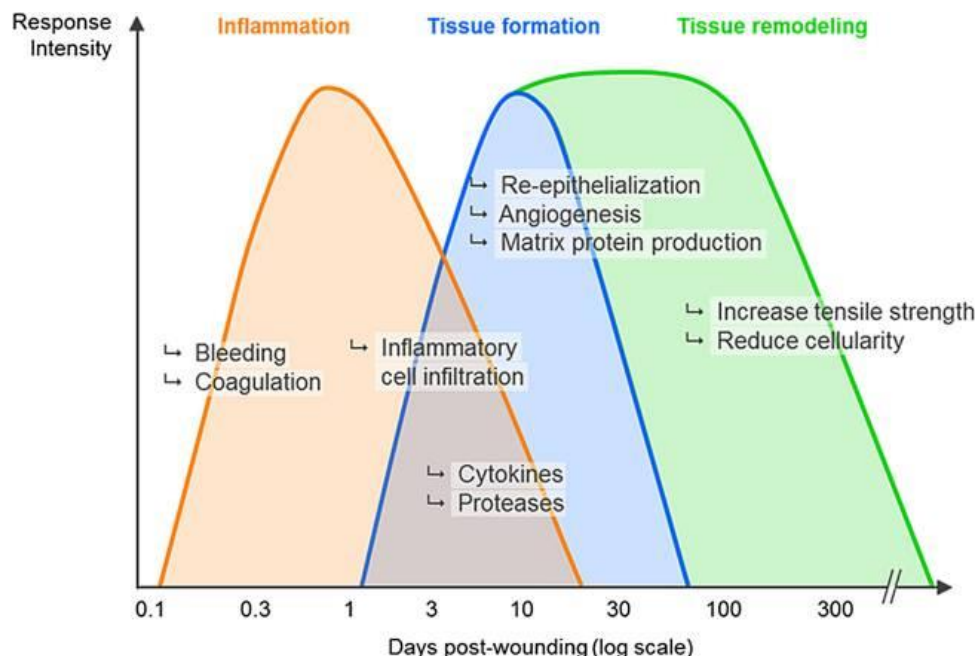
6.10. Camundongos <i>FAT-1</i> aumentaram a expressão da proteína $\alpha 7$ nAChR e reduziram pSTAT3.....	67
7. DISCUSSÃO.....	70
8. CONCLUSÃO.....	76
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
10. ANEXOS.....	83
10.1. Comitê de ética.....	83
10.2. Carta de submissão de artigo científico.....	84

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Processo de cicatrização de feridas

A pele é um órgão de múltiplas camadas que atua como uma interface entre os órgãos internos e o ambiente externo, protegendo o organismo da desidratação e da penetração de microrganismos [1]. Por outro lado, apesar de ser a principal barreira protetora, a pele está vulnerável a diferentes tipos de lesões [1-2]. Ao ser lesionada, a pele pode ser reparada através dos processos de regeneração ou de cicatrização. A regeneração caracteriza-se pela substituição específica do tecido, enquanto que a cicatrização restaura o tecido com formação de cicatriz ou fibrose [3]. Apesar destas importantes diferenças, os termos regeneração e cicatrização são geralmente utilizados como sinônimos em livros e artigos científicos, assim, no presente estudo, também utilizaremos estes termos como sinônimos.

O reparo tecidual é um processo imunológico fundamental e evolutivamente conservado [4], e usualmente caracterizado por três fases sequenciais e sobrepostas, as quais envolvem: inflamação, formação de tecido ou proliferação e remodelamento ou maturação [5] (Figura 1).



**Figura 1. Fases do processo de cicatrização de feridas (Rittié L, 2016).**

Imediatamente após a lesão tecidual, a exposição do colágeno inicia a cascata de coagulação. Trombócitos se agregam e desencadeiam a vasoconstrição com o objetivo de impedir a perda de sangue, o que resulta em hipóxia, aumento da glicólise e alterações de pH.

Plaquetas são ativadas, formando o coágulo de fibrina, que atua como uma matriz provisória da ferida. A degranulação das plaquetas ativa a cascata do complemento, estimulando células inflamatórias e a destruição de bactérias. Neste momento, uma variedade de citocinas e fatores de crescimento são liberados, mediando a comunicação e a sinergia de diferentes tipos celulares [3, 6].

A lesão tecidual expõe células residentes, tais como: queratinócitos, macrófagos, células dendríticas e mastócitos à sinais de perigo, comumente classificados em padrões moleculares associados a danos (DAMPs), isto é, moléculas liberadas por células submetidas ao estresse ou necrose, como por exemplo, proteínas intracelulares, RNA e DNA [6]. Todas essas moléculas são reconhecidas por receptores de reconhecimento de padrões, entre os quais os receptores do tipo toll like (TLR) são os mais caracterizados. Os TLRs são constitutivamente expressos em células hospedeiras e a estimulação de TLRs induz à ativação de vias de sinalização intracelular, incluindo o fator de transcrição nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B) e as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que conduzem à expressão de genes, citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos, para iniciar e perpetuar a resposta inflamatória [6].

Em resposta à quimiocinas, à cascata do complemento e aos subprodutos da degradação bacteriana, os neutrófilos são os primeiros tipos celulares a serem recrutados para o sítio lesionado na fase inflamatória. Estas células são responsáveis por fagocitarem patógenos, liberarem substâncias antimicrobianas, como espécies reativas de oxigênio (EROs), eicosanóides, peptídeos catiônicos e proteinases, além de produzirem mediadores pró-inflamatórios, tais como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), os quais irão amplificar a inflamação. Não somente os neutrófilos, mas demais leucócitos, são recrutados através de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, que induzem à expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, dentre as quais destacam-se as E-selectinas e as moléculas de adesão intercelular (ICAM) e celular vascular (VCAM), essenciais à adesão destas células na parede do endotélio e à promoção da diapedese [6-7].

Aproximadamente três dias após a lesão tecidual, monócitos são recrutados, onde no tecido se diferenciam em macrófagos e iniciam a fase proliferativa, envolvendo a formação de tecido de granulação e a liberação de citocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF). O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)



associado ao FGF favorece a proliferação de células endoteliais e a formação de novos vasos (angiogênese), essenciais para a produção de uma nova matriz extracelular (MEC), uma vez que permitem adequada oferta de oxigênio, nutrientes e migração de células imunocompetentes [6-8]. O FGF junto a outros fatores de crescimento, também favorece a infiltração de fibroblastos, os quais permanecem nas bordas da MEC, sintetizando componentes estruturais e gerando uma contração que contribui para o fechamento da ferida. Os componentes estruturais da MEC são caracterizados por três grandes classes de moléculas: proteínas estruturais (colágenos e elastina), proteínas especializadas (fibrilina, fibronectina e laminina) e proteoglicanas (glicosaminoglicanas), sendo estas, responsáveis pelo arcabouço que sustenta as células nos tecidos de todos os mamíferos, de modo que, a composição da MEC influencia a função celular [8]. Nesta etapa, células epiteliais também são recrutadas, a fim de reepitelizar o local, com a polarização e migração de queratinócitos, que irão restaurar a barreira epitelial [8-9].

A fase de remodelamento tecidual inicia-se entre duas e três semanas após a lesão e pode durar um ano ou mais. O objetivo principal desta fase consiste na reorganização, degradação e ressíntese da MEC. Citocinas anti-inflamatórias como a interleucina-10 (IL-10) e o fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ), controlam a produção de quimiocinas, levando à resolução da inflamação. Com o fechamento da ferida, o remodelamento ocorre através de níveis reduzidos de ácido hialurônico e da degradação de fibronectinas e de colágeno tipo III. Esta degradação deve-se à ação das enzimas metaloproteinases (MMPs), as quais são controladas pelos inibidores de metaloproteinases (TIMPs). Neste momento, o TGF- $\beta$  e o FGF estimulam a síntese de colágeno tipo I, caracterizado por fibras mais espessas e de organização paralela, resultando em maior resistência e na recuperação do tecido [10].

A correta cicatrização necessita da eficiência de todas estas fases que compõe o processo, sendo a interrupção em uma destas etapas, resultante do desenvolvimento de feridas crônicas não cicatrizadas [1, 2, 11]. Entretanto, embora a interrupção da cascata de eventos durante o reparo tecidual afete a regeneração tecidual, a fase inflamatória parece ser a mais crítica. O desequilíbrio na produção de mediadores pró e anti-inflamatórios favorece um microambiente, o qual mantém a ferida em um estado prolongado de inflamação, sobrepondo-se as demais etapas do processo de cicatrização [11]. Assim, a fase inflamatória torna-se essencial, sendo a transição da fase inflamatória para a proliferativa, determinante para o tempo de cicatrização.

## 1.2. Ácidos graxos poli-insaturados e cicatrização de feridas

Feridas crônicas são um problema de saúde global e novas terapias, visando à redução do tempo de cicatrização e a regeneração tecidual, têm sido propostas [1, 12-13]. Durante mais de 100 anos, a nutrição tem sido reconhecida como um fator importante no processo de cicatrização de feridas [14]. O uso da nutrição como terapia, fez surgir o conceito de imunonutrição, que pode ser definido como a utilização de elementos nutritivos específicos, numa tentativa de modular o sistema imunológico de uma forma que se aplica a uma determinada lesão ou estado de doença. Assim, uma série de estudos e revisões têm avaliado o papel das dietas imunomoduladoras (DIMS) ou seus componentes no reparo tecidual [15].

Ácidos graxos poli-insaturados como os da família ômega-6 ( $\omega$ -6) e ômega-3 ( $\omega$ -3), têm sido alvos de pesquisas relacionadas a doenças de caráter inflamatório, por serem considerados nutrientes moduladores deste processo [16]. Os ácidos graxos da família  $\omega$ -6 de cadeia longa incluem: ácido linoleico (LA), gama-linolênico (GLA) e araquidônico (AA). Já os ácidos graxos da família  $\omega$ -3 de cadeia longa incluem: ácido alfa-linolênico (ALA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) [17].

Comumente, a típica dieta ocidental é rica em ácidos graxos  $\omega$ -6, devido à abundância de LA presente nos óleos de milho, girassol e cártamo. Com isto, os ácidos graxos  $\omega$ -3 representam apenas uma pequena porcentagem da ingestão diária de gordura e são obtidos a partir de duas fontes alimentares principais: plantas e peixes. Nozes, linhaça e óleos vegetais de canola, contêm o ácido graxo  $\omega$ -3 ALA, que é um precursor metabólico dos ácidos graxos EPA e DHA. Entretanto, a conversão de ALA em EPA e DHA no organismo é ineficiente. A fonte alimentar mais concentrada de EPA e DHA é o peixe gordo, como por exemplo: atum, salmão, sardinha, entre outros [17].

Após o consumo, os ácidos graxos  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3, são incorporados nas membranas celulares, onde modulam a função de proteínas da membrana, a sinalização celular e a expressão gênica. Os ácidos graxos  $\omega$ -3 dietéticos, competem com os ácidos graxos  $\omega$ -6 para serem incorporados e, quando os ácidos graxos  $\omega$ -6 predominam nas membranas celulares, mediadores pró-inflamatórios como tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos, são produzidos através da ciclooxygenase e da 5-lipoxigenase. Por outro lado, a presença de ácidos graxos  $\omega$ -3, promove a secreção de prostaglandinas anti-inflamatórias e leucotrienos menos potentes, resultando em um microambiente menos inflamatório [17]. Contudo, o controle da inflamação pelos ácidos graxos poli-insaturados  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3, deve-se a capacidade

de alterarem a permeabilidade de membrana, dos derivados eicosanoides ligarem a fatores de transcrição e à própria ligação do ácido graxo a receptores acoplados a proteína G, como o receptor GPR120, específico de ácidos graxos  $\omega$ -3 [18].

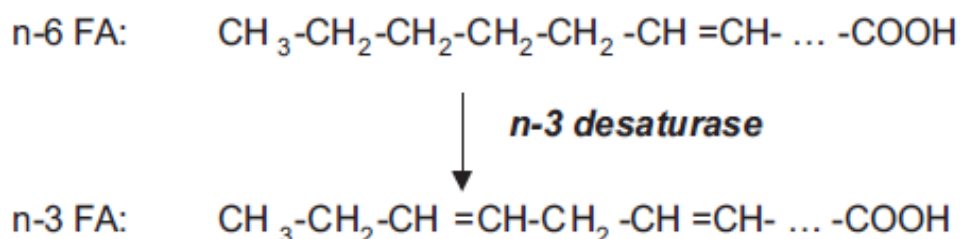
A modulação da resposta inflamatória pelos ácidos graxos  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 é estabelecida em diversas doenças. Na cicatrização de feridas, o ácido graxo LA da família  $\omega$ -6, mostrou-se benéfico, por acelerar a fase inflamatória e estimular a formação de novos vasos [19-20]. Entretanto, as funções dos ácidos graxos da família  $\omega$ -3 no processo de reparação tecidual ainda não foram determinadas [15]. Enquanto estudos demonstram que ácidos graxos  $\omega$ -3 retardam a cicatrização de feridas da pele em humanos [21], outros estudos têm demonstrado um efeito benéfico destes ácidos graxos poli-insaturados em resposta a uma lesão [22-23], sendo necessário, mais estudos que revelem o papel destes ácidos graxos na cicatrização de feridas.

### 1.3. Camundongos *FAT-1*

A suplementação dietética é uma abordagem tradicional para modificar a composição de nutrientes no tecido, a fim de verificar as funções de determinados alimentos no modelo de estudo delineado. No entanto, a suplementação ocasiona diversas variáveis entre os grupos experimentais, devido à dificuldade de padronização das dietas, para que os componentes não alterem parâmetros nutricionais, além da variável fisiológica, na qual cada indivíduo absorve quantidades diferentes do suplemento administrado, o qual também é influenciado pela dieta habitual. Assim, é inevitável que estudos com suplementação, apresentem fatores de confusão e ocasionem conflitos de resultados [24].

Particularmente, em estudos envolvendo ácidos graxos, especialmente os da família  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3, a suplementação demonstra-se complexa. Para se avaliar ácidos graxos específicos destas duas classes lipídicas e a proporção  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 no tecido, é necessário à oferta de duas diferentes dietas, as quais na maioria dos casos, não são puras, podendo então conter, outros compostos bioativos que afetam os resultados de interesse [24]. Neste caso, a produção endógena de ácidos graxos  $\omega$ -3, a partir de ácidos graxos  $\omega$ -6, seria uma abordagem ideal. Porém, devido a uma adaptação genética ocasionada pela evolução, na qual o gene *fat-1* deixou de existir em diversas espécies, esta produção tornou-se impossível. Entretanto, nematódeos como a lombriga *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), contém este gene. O gene

*fat-1*, codifica a enzima  $\Delta$ -3 desaturase, a qual introduz uma dupla ligação na posição  $\omega$ -3 na cadeia de hidrocarbonetos do  $\omega$ -6 [24-25].



**Figura 2. Conversão de ácidos graxos  $\omega$ -6 em  $\omega$ -3 pelo gene *fat-1* (Kang JX, 2007).**

Buscando uma alternativa fidedigna para se avaliar as funções específicas de ácidos graxos  $\omega$ -3 e a proporção  $\omega$ -6/ $\omega$ -3, em diferentes órgãos ou tecidos, Kang JX e colaboradores, desenvolveram o camundongo transgênico denominado *FAT-1*, no qual foi inserido o gene *fat-1*, proveniente da *C. elegans* [25].

A utilização dos camundongos transgênicos *FAT-1*, vem sendo de extrema importância em estudos destinados ao entendimento da imunomodulação exercida pelos ácidos graxos  $\omega$ -3 e da razão  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 ideal sobre o processo inflamatório, em diferentes modelos, tais como: obesidade [26-27], neuroinflamação [28-29], pancreatite [30-32], câncer [33-35], colite [36], osteoartrite [37] e hepatite [38]. Contudo, até o momento, estes camundongos não haviam sido utilizados como objeto de estudo no modelo de cicatrização de feridas.

#### 1.4. Mecanismo neuroimunológico e cicatrização de feridas

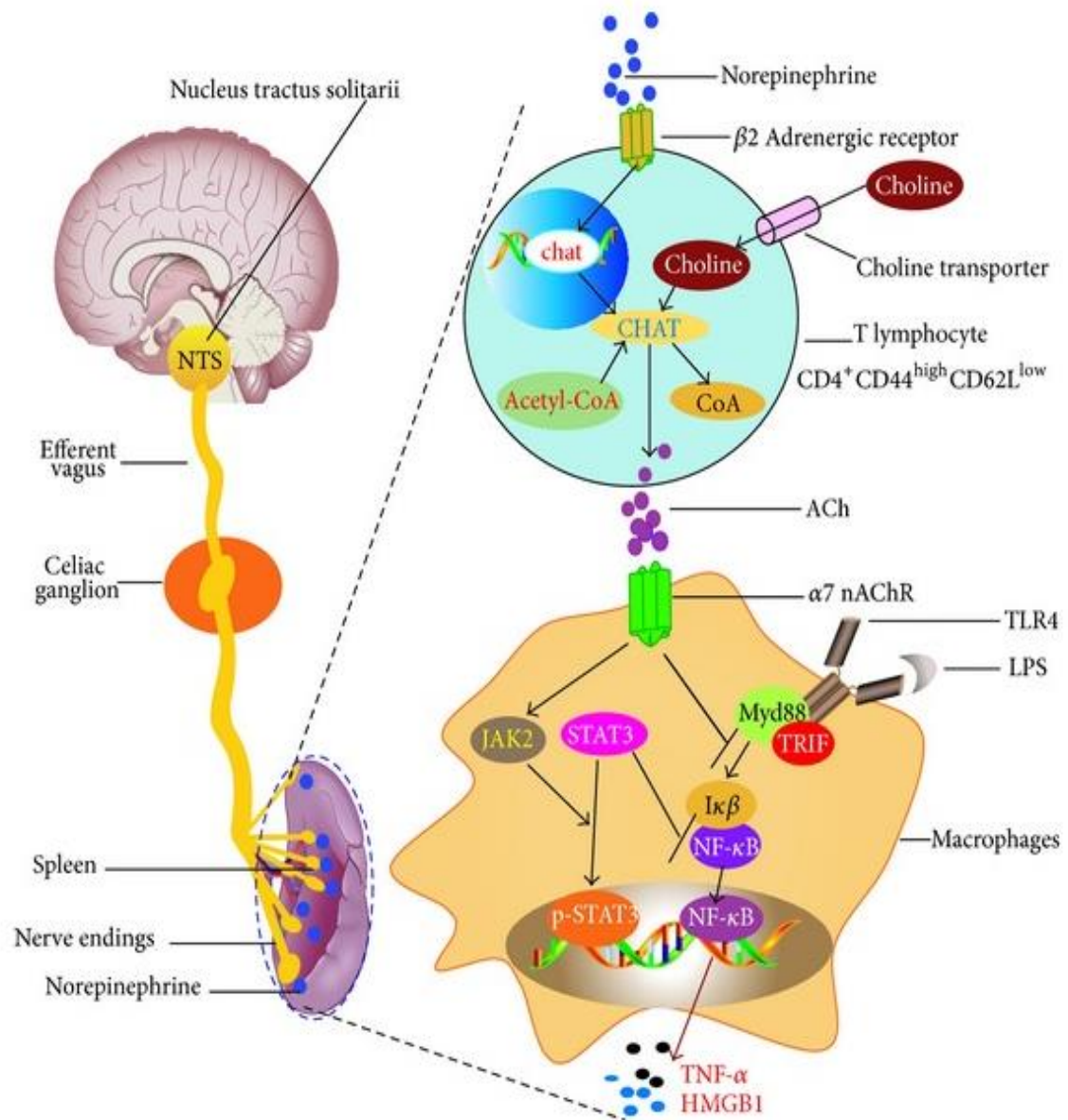
Não somente ácidos graxos poli-insaturados da família  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 podem modular o sistema imune, como cada vez mais, o sistema nervoso central (SNC) tem-se mostrado fundamental no controle da inflamação.

A hipótese de que o SNC interage com o sistema imune influenciando a resposta inflamatória, foi comprovada e descrita inicialmente em 2002, por Tracey e colaboradores. Estes pesquisadores descreveram o “reflexo inflamatório”. Neste reflexo, sinais inflamatórios decorrentes de infecções ou feridas, ativam as fibras sensoriais do nervo vago, as quais por via aferente atingem o Núcleo do Trato Solitário (NTS) no tronco cerebral da medula oblonga,

que está interligado com o núcleo motor dorsal, onde originam a maioria das fibras nervosas vagais eferentes. A partir destas regiões, a resposta é determinada e, através das vias eferentes do nervo vago, modulam o sistema imunológico [39-40].

O interesse por este mecanismo neuroimunológico fez com que estes mesmos autores e demais pesquisadores descobrissem o funcionamento deste “reflexo inflamatório” detalhadamente, denominando-o como “via anti-inflamatória colinérgica” [39-41]. Nesta via, componentes resultantes da digestão de nutrientes específicos, como também mediadores pró-inflamatórios, tais como citocinas, ativam o nervo vago aferente, fazendo com que o NTS estimule a produção de noradrenalina em órgãos como o baço. A noradrenalina, se liga em receptores  $\beta_2$  adrenérgicos presentes em células T, favorecendo a síntese de acetilcolina (ACh). A ACh é o principal neurotransmissor da via anti-inflamatória colinérgica, produzida pela colina + acetil-coenzima A (acetil-coA), nos terminais pré-sinápticos de neurônios colinérgicos. Após ser produzida, a ACh é transportada em vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de ACh (VAChT) e então é liberada na fenda sináptica, ligando-se em receptores específicos do tipo muscarínicos e nicotínicos de células imunológicas [42-43]. Entretanto, a subunidade  $\alpha 7$  do receptor nicotínico de ACh ( $\alpha 7$ AChR), é quem medeia a ativação da via [44]. A ligação da ACh ao receptor, precisa ser coordenada e regulada, para que a via anti-inflamatória colinérgica não seja superativada ou deficiente. Assim, a acetilcolinesterase (AChE) atua degradando a ACh em colina livre e acetato, impedindo que se ligue no receptor [45].

A descoberta desta via atribuiu ao SNC a capacidade de regular a inflamação nos tecidos periféricos e reestabelecer a homeostasia [41]. Na cicatrização de feridas, diversos estudos têm demonstrado a participação da via anti-inflamatória colinérgica no controle da fase inflamatória e, portanto, na melhora da reparação tecidual [46-48]. A ativação de receptores nicotínicos através da ACh ou agonistas colinérgicos, mostrou reduzir níveis de IL- $1\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , por influenciar negativamente as vias JAK2/STAT3 e o NF-kB [47-48]. Uma vez que a  $\alpha 7$ AChR esteja ativada, o transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3) é fosforilado em tirosina<sup>705</sup> pela Janus tirosina-quinase (JAK2) associada ao receptor e então, sua forma homo ou heterodímera transloca-se para o núcleo celular, onde impulsiona a transcrição por ligação a sequências específicas, regulando a expressão gênica. Concomitantemente, a STAT3 quando fosforilada, bloqueia NF-kB, impedindo que transcreva mediadores pró-inflamatórios [42].



**Figura 3. Via anti-inflamatória colinérgica (Haiya Wu.; et al, 2014).**

Em paralelo, comprovou-se que uma dieta rica em ácidos graxos, pode estimular a via anti-inflamatória colinérgica, através da liberação de colecistoquinina [49] e, que a administração de óleo de peixe ( $\omega$ -3) reduziu a inflamação em condições neuroinflamatórias [41], instigando à possibilidade de que ácidos graxos também podem modular a inflamação, através da ativação desta via.

## **2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO PRESENTE TRABALHO**

### **2.1. Justificativa do presente trabalho**

Ácidos graxos poli-insaturados da família  $\omega$ -3, são hoje, nutrientes de comum consumo e prescrição, uma vez que são classificados como anti-inflamatórios, sendo eficazes na prevenção e tratamento de diversas doenças de caráter crônico/inflamatório [17]. Entretanto, a função destes ácidos graxos na cicatrização de feridas, ainda não é estabelecida [15].

Sabe-se, que estes ácidos graxos, modulam a inflamação ao se ligarem em receptores específicos acoplados a membrana, ao atravessarem a membrana e atuarem diretamente no núcleo celular ou ao serem incorporados na membrana alterando sua permeabilidade. Com isto, uma variedade de vias de transcrição e inflamatórias são moduladas [18].

A via anti-inflamatória colinérgica, é um mecanismo neuro-imunológico, no qual a digestão de ácidos graxos ou citocinas pró-inflamatórias, ativam o nervo vago, fazendo com que neurônios pré-sinápticos produzam neurotransmissores colinérgicos, como a ACh, que irá se ligar em receptores presentes em células do tecido lesionado, fazendo-as com que reduzam a inflamação [42, 49].

Assim, no presente trabalho, considerando que tanto os ácidos graxos  $\omega$ -3 como a via anti-inflamatória colinérgica, são importantes meios de controle da inflamação e, que a influencia destes ácidos graxos sobre esta via, ainda não foi avaliada, nos propusemos a investigar, se ácidos graxos da família  $\omega$ -3, modulam a fase inflamatória do processo de cicatrização de feridas cutâneas e se a via anti-inflamatória colinérgica é um mecanismo de ação destes ácidos graxos. Como objeto de estudo, utilizamos camundongos *FAT-1*, os quais produzem ácidos graxos  $\omega$ -3 endógeno, a fim de se obter resultados fidedignos da função biológica destes ácidos graxos, sem que fatores confundentes advindos da suplementação interferissem em nosso trabalho [25].

### **2.2. Hipótese do presente trabalho**

A inflamação é uma resposta fisiológica determinante para a correta reparação tecidual e, ácidos graxos da família  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3, assim como a via anti-inflamatória colinérgica, modulam esta resposta [2, 16, 48].

Camundongos transgênicos *FAT-1*, produzem ácidos graxos  $\omega$ -3 a partir de ácidos graxos  $\omega$ -6, endogenamente [25]. Acreditamos, que o aumento da incorporação de ácidos graxos  $\omega$ -3 na pele de camundongos *FAT-1*, reduzindo a proporção  $\omega$ -6/ $\omega$ -3, modifique o perfil inflamatório do processo de cicatrização de feridas, influenciando no fechamento da ferida e que estes efeitos são decorrentes da ativação da via anti-inflamatória colinérgica.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o processo de cicatrização de feridas na pele em camundongos *FAT-1*, caracterizando a resposta inflamatória tardia em relação aos camundongos não transgênicos *C57 black/6*, através de uma investigação neuroimunológica.

#### 3.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- Analisar a composição lipídica do plasma, do tecido não cicatricial e cicatricial de 3 dias;
- Avaliar o fechamento da ferida;
- Investigar a atividade enzimática da MPO no tecido cicatricial de 1, 3, 5 e 12 dias;
- Analisar a expressão gênica de marcadores celulares por PCR em tempo real no tecido não cicatricial e cicatricial de 3 dias;
- Avaliar a produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no tecido não cicatricial e cicatricial de 3 dias;
- Avaliar a expressão gênica por PCR *array* específico para cicatrização de feridas no tecido cicatricial de 3 dias;
- Quantificar a produção de ACh e colina livre no tecido cicatricial de 3 dias;
- Avaliar a atividade enzimática da AChE no tecido cicatricial de 3 dias;
- Quantificar a expressão das proteínas:  $\alpha 7nAChR$ , STAT3 total e STAT3 fosforilada (pSTAT3) no tecido cicatricial de 3 dias.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Animais e tratamento

Foram utilizados camundongos transgênicos *FAT-1* e não transgênicos *C57black/6* (como controles) que possuíam o mesmo *background* genético que o grupo *FAT-1*. Assim, os camundongos foram divididos em dois grupos: *FAT-1* e *wild type* (WT). Todos os camundongos eram machos adultos (2 meses de idade) e foram mantidos, no biotério Central da Faculdade de Ciências Aplicadas da UNICAMP, em ciclo claro/escuro de 12 horas, em temperatura aproximada de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

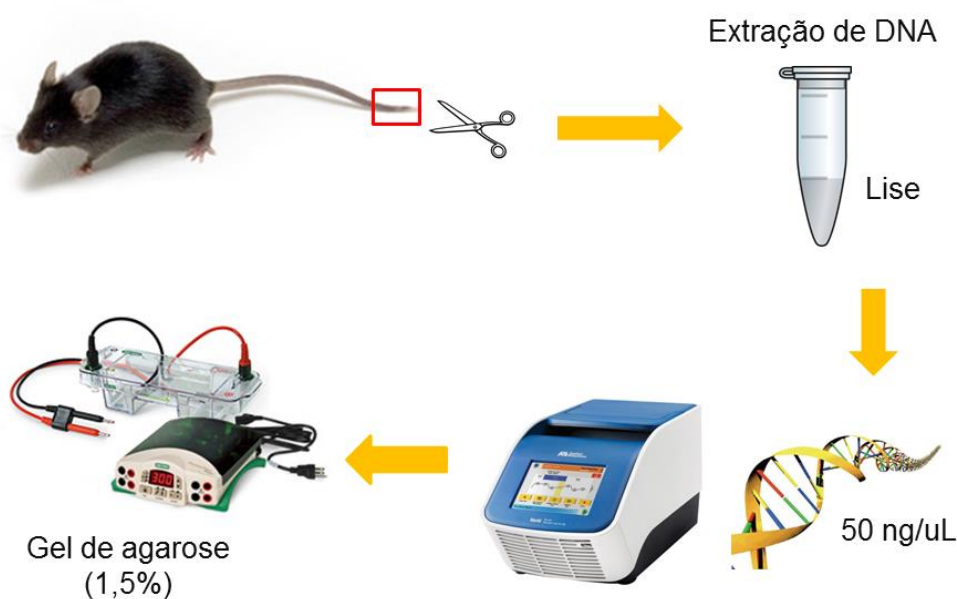
Ao contrário da maioria dos estudos com camundongos *FAT-1*, em nosso estudo, os camundongos consumiram uma dieta padrão, não sendo ofertada, uma dieta rica em ácidos graxos  $\omega$ -6, como é proposto. A escolha da dieta padrão deveu-se através de estudos que demonstraram que ácidos graxos da família  $\omega$ -6, como o ácido graxo linoleico (LA), acelera a fase inflamatória do processo de cicatrização de feridas, beneficiando a reparação tecidual (Rodrigues HG.; et al, 2012; Rodrigues HG.; et al, 2016). Deste modo, a dieta padrão, preveniu qualquer modulação da resposta inflamatória, no grupo WT.

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - 4175-1) e pelo Comitê Interno de Biossegurança (CiBIO - 370) da Faculdade de Ciências Aplicadas/ UNICAMP.

### 4.2. Genotipagem

Camundongos recém-desmamados foram anestesiados com Isoflurano e uma pequena parte da cauda (0,5 cm) foi coletada. As caudas foram colocadas em eppendorfs de 1,5 mL. Para a extração do DNA, adicionou-se à cauda, 200 uL de proteinase K diluída em tampão de lise, incubando-a a  $50^{\circ}\text{C}$  overnight. Posteriormente, adicionou-se 200 uL de tampão de lise, vortexando cada eppendorf por 2 minutos, deixando-os incubar em seguida por 15 minutos em temperatura ambiente. Após incubação, centrifugou-se a 10.000 rpm por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf, adicionado de 500 uL de etanol 100% (gelado) e centrifugado a 6.000 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi desprezado por inversão, sendo adicionado mais 500 uL de etanol 70% (gelado) e centrifugado novamente nas mesmas condições. Os eppendorfs foram então deixados

invertidos sobre uma estrutura plana, para retirar o excesso de etanol e secar o pellet. Após secagem, ressuspendeu-se o pellet em 40 ou 80 uL (quantidade proporcional ao pellet) de Tris EDTA. As amostras foram incubadas durante 30 minutos a 65°C, sendo o DNA quantificado posteriormente. Para a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizou-se tampão específico (2,5 uL), MgCl<sub>2</sub> (1,5 uL), DNTP (0,5 uL), *primer sense* (0,5 uL) (5'-ACCAACTGTGGATGCTTTCC-3') e *primer anti-sense* (0,5 uL) (5'-GCATTGCTTCCCAATCCTTA-3'), Taq DNA *polymerase platinum* (0,1 uL) (Invitrogen, Carlsbad, CA) e água livre de RNase (17,4 uL). Em eppendorfs de 0,1 mL, adicionou-se 23 uL do mix, mais 2 uL do DNA extraído (volume correspondente a 50 ng/uL de DNA), sendo posteriormente colocados no termociclador para a PCR. Para a eletroforese, preparou-se o gel de agarose (1,5%), e colocou-o em tampão TBE 1x com 5 uL de *Sybr Safe*. Nos poços do gel pronto, foi adicionado no primeiro poço 9 uL de *ladder* (100 pares de base) diluído em *loading buffer* 6x (2 uL de *ladder* + 10 uL corante) e no restante dos poços, foram adicionados o produto da PCR, diluídos com *loading buffer* 6x na mesma proporção que o *ladder*. A banda em 400 pb indica que o animal é *FAT-1*.



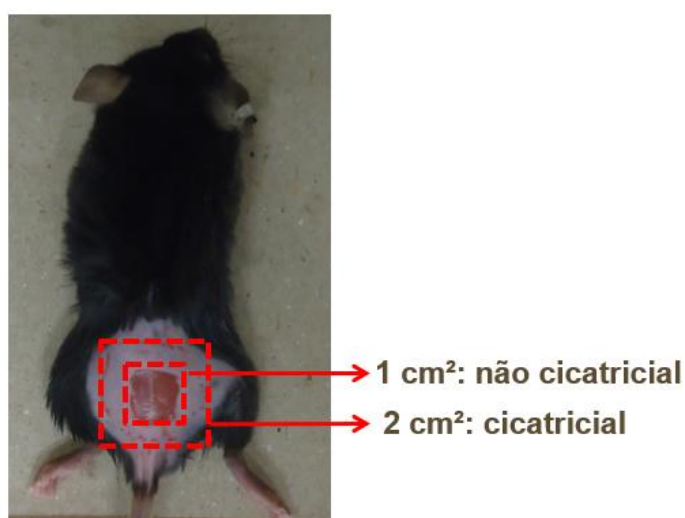
**Figura 4. Procedimento de genotipagem.**

#### 4.3. Indução das feridas e análise macroscópica do fechamento da ferida

Os camundongos foram anestesiados com ketamina (139,2 mg/kg de peso corporal) e xilazina (18,4 mg/kg de peso corporal) e com um molde de 1 cm<sup>2</sup>, demarcou-se a pele da

região dorsal, sendo esta área removida cirurgicamente e representando o tecido não cicatricial. Para a coleta do tecido cicatricial de demais tempos, utilizou-se um molde de 2 cm<sup>2</sup>, sendo este tecido removido e dividido para diferentes análises.

Para avaliar o fechamento das feridas, as mesmas foram fotografadas no dia da indução da ferida e diariamente após a indução, com câmera *cyber shot Sony* (DSC-S950S 4X 10MP com zoom ótico) pelo mesmo examinador. Após a digitalização, a área da ferida foi medida utilizando o programa *Image J*. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) da área da ferida original.



**Figura 5. Indução da ferida dorsal.**

#### **4.4. Homogeneização do tecido cicatricial**

Os tecidos coletados após a indução das feridas foram imediatamente acondicionados em gelo seco e mantidos no freezer (-80°C) até serem homogeneizados, com exceção de procedimentos experimentais que necessitaram do tecido fresco. Para homogeneização, os tecidos foram picotados manualmente com uma tesoura cirúrgica e em seguida, foi adicionado 1 mL de tampão específico. As amostras foram homogeneizadas com auxílio de *polytron* (*Kinematica Dispersing and Mixing Technology, Lucerne, Switzerland*), centrifugadas e o sobrenadante coletado para análises.



**Figura 6. Homogeneização do tecido.**

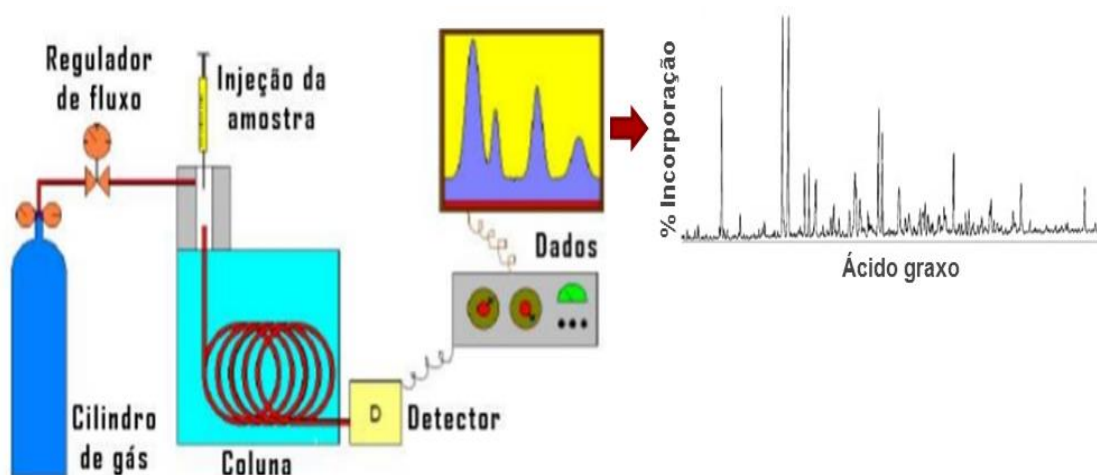
#### **4.5. Análise da composição lipídica do plasma e do tecido cicatricial de 3 dias por cromatografia gasosa**

Para análise da composição lipídica do plasma, coletou-se o soro de ambos os grupos no terceiro dia após a indução da ferida e realizou-se a extração de lipídios totais.

O processo de extração de lipídios totais, requer a diluição da amostra em 0,9% NaCl, para um volume total de 0,8 mL. Para um volume de 70  $\mu$ L de plasma utilizado, 20  $\mu$ L do padrão interno (classe lipídica) foi adicionado. Juntamente, adicionou-se 5 mL de clorofórmio: metanol (2:1) contendo BHT (butil hidroxi tolueno) (50 mg/L) e 1 mL de 1M NaCl. Após centrifugação a 2.000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente, coletou-se a fase inferior, sendo esta seca no nitrogênio a 40°C. Após secagem, para a preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos, 500  $\mu$ L de tolueno e 1 mL de reagente de metilação (metanol + 2%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) foram adicionados, sendo as amostras mantidas a 55°C durante 2 horas. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução neutralizante (0,25M  $\text{KHCO}_3$  + 0,5M  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) e 1 mL de hexano, sendo as amostras centrifugadas a 1.000 rpm por 2 minutos em temperatura ambiente. A fase superior foi coletada e seca no nitrogênio a 40°C. Em seguida, as amostras foram diluídas em 150  $\mu$ L de hexano e transferidas para o frasco de injeção do cromatógrafo, para análise segundo descrito por (Fisk HL.; et al, 2014).

Para a análise das classes lipídicas do tecido não cicatricial e cicatricial de 3 dias, lipídios totais foram extraídos pela adição de 5 mL de clorofórmio: metanol (2:1) contendo BHT, agindo através de um vórtex a cada 10 minutos durante 30 minutos, para assegurar a

extração completa de lipídios. Adicionou-se então, 1 mL de 1M NaCl e as amostras foram vortexadas e centrifugadas a 2.000 rpm durante 10 min. A fase inferior contendo os lipídios totais, foi coletada e seca no nitrogênio a 40 °C. Fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletalona (PE), ácidos graxos não esterificados (NEFA), ésteres de colesterol (CE) e triacilglicerol (TAG), foram separados e coletados por meio de extração em fase sólida (SPE). Os lipídios totais secos, foram ressuspensos em 1 mL de clorofórmio e aplicados a um cartucho de aminopropilsilica. TAG e CE foram eluídos através de 2 lavagens de 1 mL de clorofórmio sob vácuo e secos no nitrogênio a 40 °C. PC foi então eluída, pela adição de 2 mL de clorofórmio: metanol (60: 40, v/v), PE através da adição de 2 mL de metanol e NEFA pela adição de 2 mL de clorofórmio: metanol: ácido acético glacial ( 100: 2: 2, v/ v/v), sob vácuo. Os cartuchos de aminopropilsilica foram lavados 4 vezes com 1 mL de hexano sob vácuo. TAG e CE secos, foram dissolvidos em 1 mL de hexano e aplicados no cartucho de aminopropilsilica. Para coleta de CE, 2 mL de hexano foram adicionados, e em seguida, mais 2 mL de hexano: clorofórmio: etil acetato (100: 5: 5) foram adicionados sob vácuo, para eluição de TAG. As frações lipídicas foram então secas no nitrogênio a 40 °C. Os ácidos graxos presentes nas frações de PC, PE, NEFA, CE e TAG foram metilados e analisados sob mesmo protocolo do plasma, descrito por (Fisk HL.; et al, 2014).



**Figura 7. Cromatografia gasosa.**

#### **4.6. Análise da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) no tecido cicatricial de 1, 3, 5 e 12 dias**

A atividade da enzima MPO foi medida no tecido cicatricial de 1, 3, 5 e 12 dias após a realização das feridas. Tecidos frescos foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (50 mM), pH 6,0 contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (*Sigma Aldrich*,  $\geq 98\%$ ), em seguida centrifugados a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Alíquotas do sobrenadante (20  $\mu$ L) foram adicionadas em placas de 96 poços juntamente com o tampão fosfato de potássio, o-dianisidina e uma solução 20 mM de peróxido de hidrogênio. Os resultados foram normalizados pela quantidade de proteína no tecido.

#### **4.7. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real no tecido não cicatricial e cicatricial de 3 dias**

Para a análise da expressão gênica de marcadores celulares, tecidos não cicatriciais e cicatriciais de 3 dias, foram homogeneizados em trizol e centrifugados a 2.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.

O RNA total do tecido das feridas foi obtido usando o Kit RNAeasy (*Qiagen, Maryland, USA*) conforme descrito pelo fabricante. O tecido cicatricial homogeneizado foi incubado durante 2 minutos em temperatura ambiente. Um volume de 200  $\mu$ L de clorofórmio foi adicionado aos tubos e centrifugados a 12.000 rpm. A fase aquosa foi transferida para outro tubo, sendo adicionados 600  $\mu$ L de etanol a 70%. Transferiu-se a solução para a coluna do kit e após um *spin* o RNA ficou retido na coluna. Após lavagem com o tampão RW1 do kit, adicionou-se 80  $\mu$ L de DNase (*Qiagen, Maryland, USA*) e as amostras foram incubadas em temperatura ambiente durante 15 minutos. Após nova lavagem, a amostra foi ressuspensa em água livre de RNase. Quantificou-se o RNA através da medida da sua absorbância a 260 nm. A pureza do RNA foi avaliada pela razão 260/280 nm.

O cDNA foi sintetizado utilizando 3  $\mu$ g de RNA e 4  $\mu$ L do kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (*High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit Applied Biosystems, Foster City, CA*) em volume final de 20  $\mu$ L. O cDNA foi armazenado a -80 °C até a realização da PCR.

Primeiramente determinou-se o gene *housekeeping*. Foram avaliados os controles endógenos: B2M, Hrpt, YWHAZ,  $\beta$ -actina, HMBS e UBC.

Posteriormente, avaliaram-se os marcadores celulares: CD11c, CD206, CD280, iNOS, MPO, Arginase I, Resistina (*Resistin-like molecule alpha*), Elastase (*Neutrophil elastase*), ICAM-1 e VCAM-1 (**Tabela 1**).

Na reação de PCR, foram utilizados: 4,75 µL de água livre de RNase, 0,125 µL do *primer sense* e 0,125 µL do *primer anti sense* e 6,25 µL de *Sybr* (*Applied Biosystems, Warrington, UK*). Para cada componente do mix, multiplicou-se o volume pelo número de amostras + 1. Na placa, pipetou-se 11,25 µL do mix + 1,25 µL de cDNA de cada amostra, por poço, em duplicatas. A concentração de cDNA de cada amostra para a reação é de 2 ng/µL.

Na análise estatística, os valores foram normalizados pela média do delta CT do tecido não cicatricial do WT.

Gene	Primer Sense	Primer Anti Sense
UBC	ACAGACGTACCTTCCTCACCA	CCCCATCACACCCAAGAACAA
CD11c	ACACAGACTGACCCTTCCCT	TGTACCGCACCCCTCCATCTA
CD206 – MRC1	TTCAGCTATTGGACGCGAGG	GAATCTGACACCCAGCGGAA
CD280 – MRC2	CACCGGGAAAACCTAGACCC	CCAGTCCTCTTGTCTGGCTG
INOS	AAATGTAGAGGTGGCCCTGC	AAATGTAGAGGTGGCCCTGC
MPO	AGTTGTGCTGAGCTGTATGGA	CGGCTGCTTGAAGTAAAACAGG
Arginase 1	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	AGGAGCTGTCATTAGGGACATC
Resistin-like molecule alpha	CCAATCCAGCTAACTATCCCTCC	CCAGTCAACGAGTAAGCACAG
Neutrophil elastase	CAGGAACTTCGTCATGTCAGC	AGCAGTTGTGATGGGTCAAAG
ICAM-1	GCTACCATCACCGTGTATTCG	TAGCCAGCACCGTGAATGTG
VCAM-1	TTGGGAGCCTCAACGGTACT	GCAATCGTTTTGTATTTCAGGGGA

**Tabela 1. Sequência dos primers sense e anti sense dos marcadores celulares.**

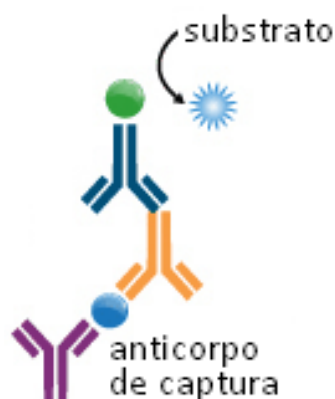
#### **4.8. Quantificação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento no tecido não cicatricial e cicatricial de 3 dias**

Os tecidos não cicatriciais e cicatriciais de 3 dias, foram homogeneizados em PBS + inibidor de protease e centrifugados a 2.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.

A produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , ligante 1 de quimiocina CXC (CXCL1), ligante 2 de quimiocina CXC (CXCL2), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e inibidor de metaloproteinase-1 (TIMP-1), foi avaliada, através do método de ELISA utilizando *Kits Duo Set* (*R&D System, Mineapolis, MN, USA*), conforme instruções do fabricante. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm. Para as análises



estatísticas, os dados foram normalizados com a concentração de proteína tecidual, quantificada pelo método de Bradford (Bradford MM., 1976).



**Figura 8. Método ELISA.**

#### 4.9. Análise da expressão gênica por PCR-array específico para cicatrização de feridas no tecido cicatricial de 3 dias

A análise da expressão de genes presentes no processo de cicatrização de feridas foi realizada através de PCR array (*PCR array Mouse Wound Healing – PAMM-121Z, Qiagen, Maryland, USA*) específico para o processo de reparo tecidual, no qual avaliou-se 84 genes relacionados com as diferentes fases da cicatrização, seguindo as instruções do fabricante.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Acta2	Actc1	Angpt1	Ccl12	Ccl7	Cd40lg	Cdh1	Col14a1	Col1a1	Col1a2	Col3a1	Col4a1
B	Col4a3	Col5a1	Col5a2	Col5a3	Csf2	Csf3	Ctgf	Ctnnb1	Ctsg	Ctsk	Ctsl	Cxcl1
C	Cxcl11	Cxcl3	Cxcl5	Egf	Egfr	F13a1	F3	Fga	Fgf10	Fgf2	Fgf7	Hbegf
D	Hgf	Ifng	Igf1	Il10	Il1b	Il2	Il4	Il6	Il6st	Itga1	Itga2	Itga3
E	Itga4	Itga5	Itga6	Itgav	Itgb1	Itgb3	Itgb5	Itgb6	Mapk1	Mapk3	Mif	Mmp1a
F	Mmp2	Mmp7	Mmp9	Pdgfa	Plat	Plau	Plaur	Plg	Pten	Ptgs2	Rac1	Rhoa
G	Serpine1	Stat3	Tagln	Tgfa	Tgfb1	Tgfb3	Timp1	Tnf	Vegfa	Vtn	Wisp1	Wnt5a
H	Actb	B2m	Gapdh	Gusb	Hsp90ab1	MGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

**Figura 9. Array layout.**

Posição	UniGene	GenBank	Símbolo	Descrição
A01	Mm.213025	NM_007392	Acta2	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
A02	Mm.686	NM_009608	Actc1	Actin, alpha, cardiac muscle 1
A03	Mm.309336	NM_009640	Angpt1	Angiopoietin 1
A04	Mm.867	NM_011331	Ccl12	Chemokine (C-C motif) ligand 12
A05	Mm.341574	NM_013654	Ccl7	Chemokine (C-C motif) ligand 7
A06	Mm.4861	NM_011616	Cd40lg	CD40 ligand
A07	Mm.35605	NM_009864	Cdh1	Cadherin 1
A08	Mm.297859	NM_181277	Col14a1	Collagen, type XIV, alpha 1
A09	Mm.277735	NM_007742	Col1a1	Collagen, type I, alpha 1
A10	Mm.277792	NM_007743	Col1a2	Collagen, type I, alpha 2
A11	Mm.249555	NM_009930	Col3a1	Collagen, type III, alpha 1
A12	Mm.738	NM_009931	Col4a1	Collagen, type IV, alpha 1
B01	Mm.389135	NM_007734	Col4a3	Collagen, type IV, alpha 3
B02	Mm.7281	NM_015734	Col5a1	Collagen, type V, alpha 1
B03	Mm.10299	NM_007737	Col5a2	Collagen, type V, alpha 2
B04	Mm.334994	NM_016919	Col5a3	Collagen, type V, alpha 3
B05	Mm.4922	NM_009969	Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
B06	Mm.1238	NM_009971	Csf3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)
B07	Mm.390287	NM_010217	Ctgf	Connective tissue growth factor
B08	Mm.291928	NM_007614	Ctnnb1	Catenin (cadherin associated protein), beta 1
B09	Mm.4858	NM_007800	Ctsg	Cathepsin G
B10	Mm.272085	NM_007802	Ctsk	Cathepsin K
B11	Mm.930	NM_009984	Ctsl	Cathepsin L
B12	Mm.21013	NM_008176	Cxcl1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
C01	Mm.131723	NM_019494	Cxcl11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11
C02	Mm.244289	NM_203320	Cxcl3	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3
C03	Mm.4660	NM_009141	Cxcl5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5
C04	Mm.252481	NM_010113	Egfr	Epidermal growth factor
C05	Mm.8534	NM_007912	Egfr	Epidermal growth factor receptor
C06	Mm.235105	NM_028784	F13a1	Coagulation factor XIII, A1 subunit
C07	Mm.273188	NM_010171	F3	Coagulation factor III
C08	Mm.88793	NM_010196	Fga	Fibrinogen alpha chain
C09	Mm.317323	NM_008002	Fgf10	Fibroblast growth factor 10
C10	Mm.473689	NM_008006	Fgf2	Fibroblast growth factor 2
C11	Mm.330557	NM_008008	Fgf7	Fibroblast growth factor 7
C12	Mm.289681	NM_010415	Hbegf	Heparin-binding EGF-like growth factor
D01	Mm.267078	NM_010427	Hgf	Hepatocyte growth factor
D02	Mm.240327	NM_008337	Ifng	Interferon gamma
D03	Mm.268521	NM_010512	Igf1	Insulin-like growth factor 1
D04	Mm.874	NM_010548	Il10	Interleukin 10
D05	Mm.222830	NM_008361	Il1b	Interleukin 1 beta
D06	Mm.14190	NM_008366	Il2	Interleukin 2
D07	Mm.276360	NM_021283	Il4	Interleukin 4
D08	Mm.1019	NM_031168	Il6	Interleukin 6
D09	Mm.4364	NM_010560	Il6st	Interleukin 6 signal transducer

Posição	UniGene	GenBank	Símbolo	Descrição
D10	Mm.482186	NM_001033228	Itga1	Integrin alpha 1
D11	Mm.5007	NM_008396	Itga2	Integrin alpha 2
D12	Mm.57035	NM_013565	Itga3	Integrin alpha 3
E01	Mm.31903	NM_010576	Itga4	Integrin alpha 4
E02	Mm.16234	NM_010577	Itga5	Integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha)
E03	Mm.225096	NM_008397	Itga6	Integrin alpha 6
E04	Mm.227	NM_008402	Itgav	Integrin alpha V
E05	Mm.263396	NM_010578	Itgb1	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)
E06	Mm.87150	NM_016780	Itgb3	Integrin beta 3
E07	Mm.6424	NM_010580	Itgb5	Integrin beta 5
E08	Mm.98193	NM_021359	Itgb6	Integrin beta 6
E09	Mm.196581	NM_011949	Mapk1	Mitogen-activated protein kinase 1
E10	Mm.8385	NM_011952	Mapk3	Mitogen-activated protein kinase 3
E11	Mm.2326	NM_010798	Mif	Macrophage migration inhibitory factor
E12	Mm.156952	NM_032006	Mmp1a	Matrix metalloproteinase 1a (interstitial collagenase)
F01	Mm.29564	NM_008610	Mmp2	Matrix metalloproteinase 2
F02	Mm.4825	NM_010810	Mmp7	Matrix metalloproteinase 7
F03	Mm.4406	NM_013599	Mmp9	Matrix metalloproteinase 9
F04	Mm.2675	NM_008808	Pdgfa	Platelet derived growth factor, alpha
F05	Mm.154660	NM_008872	Plat	Plasminogen activator, tissue
F06	Mm.4183	NM_008873	Plau	Plasminogen activator, urokinase
F07	Mm.1359	NM_011113	Plaur	Plasminogen activator, urokinase receptor
F08	Mm.971	NM_008877	Plg	Plasminogen
F09	Mm.245395	NM_008960	Pten	Phosphatase and tensin homolog
F10	Mm.292547	NM_011198	Ptgs2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
F11	Mm.292510	NM_009007	Rac1	RAS-related C3 botulinum substrate 1
F12	Mm.757	NM_016802	Rhoa	Ras homolog gene family, member A
G01	Mm.250422	NM_008871	Serpine1	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1
G02	Mm.249934	NM_011486	Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
G03	Mm.283283	NM_011526	Tagln	Transgelin
G04	Mm.137222	NM_031199	Tgfa	Transforming growth factor alpha
G05	Mm.248380	NM_011577	Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1
G06	Mm.200775	NM_011578	Tgfb3	Transforming growth factor, beta receptor III
G07	Mm.8245	NM_011593	Timp1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
G08	Mm.1293	NM_013693	Tnf	Tumor necrosis factor
G09	Mm.282184	NM_009505	Vegfa	Vascular endothelial growth factor A
G10	Mm.3667	NM_011707	Vtn	Vitronectin
G11	Mm.10222	NM_018865	Wisp1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1
G12	Mm.287544	NM_009524	Wnt5a	Wingless-related MMTV integration site 5A
H01	Mm.328431	NM_007393	Actb	Actin, beta
H02	Mm.163	NM_009735	B2m	Beta-2 microglobulin
H03	Mm.343110	NM_008084	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	Mm.3317	NM_010368	Gusb	Glucuronidase, beta
H05	Mm.2180	NM_008302	Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1
H06	N/A	SA_00106	MGDC	Mouse Genomic DNA Contamination
H07	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H08	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H09	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H11	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control

Tabela 2. Descrição dos genes para *PCR array*.

#### 4.10. Quantificação de ACh e colina livre no tecido cicatricial de 3 dias

Para determinar a concentração de ACh, a colina livre e a colina total foram quantificadas por método colorimétrico (*Biovision Incorporated, Milpitas, CA, EUA*). Aproximadamente 100 mg de tecido cicatricial fresco de 3 dias, foram homogeneizados em 500 uL de *choline assay buffer* e depois centrifugadas a 2.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Na placa de 96 poços, pipetou-se: 0, 2, 4, 6, 8 e 10 uL do padrão (*standard choline* 0,5 nmol/uL) diluído em *choline assay buffer* para um volume final de 50 uL/poço. Posteriormente, foram pipetadas as amostras diluídas em tampão (15 uL de amostra em 35 uL de *choline assay buffer*). Para quantificar a colina total, preparou-se o mix: 46 uL de *choline assay buffer*, 2 uL de *choline probe* e 2 uL de *enzyme mix*, sendo estes valores multiplicados pelo número de amostras + 1. Para quantificar a colina livre, preparou-se outro mix contendo: 44 uL de *choline assay buffer*, 2 uL de *choline probe*, 2 uL de acetilcolinesterase e 2 uL de *enzyme mix*. Após a adição do mix sobre as amostras, a placa foi incubada durante 30 minutos em temperatura ambiente, protegida da luz. A leitura colorimétrica foi realizada a 570 nm.

#### 4.11. Análise da atividade enzimática da AChE no tecido cicatricial de 3 dias

Fragmentos de tecido cicatricial fresco de 3 dias, foram homogeneizados em tampão fosfato 0,1 M e centrifugados a 8.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Na placa de 96 poços, adicionou-se em triplicata: 26 uL de amostra + 170 uL de tampão fosfato 0,1 M + 6 uL de ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) e realizou-se a leitura basal espectrofotometricamente. Em seguida, adicionou-se 10 uL/poço do substrato (iodeto de ACh) para formar o ânion 5-tio-2-nitrobenzoato de cor amarela, produzido na reação de hidrólise da ACh mediada pela AChE. A leitura foi realizada a 412 nm, durante um período de 10 minutos, com intervalos de 2 minutos, sendo a mudança na absorbância, determinada por minuto.

Para análise estatística, os dados foram normalizados com a concentração de proteína tecidual, quantificada com biureto. Para isto, em uma placa de 96 poços, adicionou-se em triplicata: 8 uL de tampão fosfato 0,1 M, 8 uL do padrão de proteínas estatais e 8 uL de amostra. Posteriormente, adicionou-se 200 uL de biureto em cada um destes poços e a placa foi incubada durante 15 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz, para consequente leitura.

#### 4.12. Análise da expressão proteica da $\alpha 7$ nAChR, STAT3 total e pSTAT3 (*Western blotting*) no tecido cicatricial de 3 dias

Fragmentos de tecido cicatricial fresco de 3 dias, foram homogeneizados em tampão de imunoprecipitado (1% [v/v] de Triton X-100; 0,1 mol/L de Tris, pH 7,4; 0,1 mol/L de pirofosfato de sódio; 0,1 mol/L de fluoreto de sódio; 0,01 mol/L de etilenodiaminotetra ácido; 0,01 mol/l de vanadato de sódio; 0,002 mol/L de fluoreto de fenilmetano-sulfonilo e 0,01 mg/ml de aprotinina). O material insolúvel foi removido por centrifugação a 12.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. A concentração de proteína no sobrenadante foi determinada utilizando o método de Bradford. O sobrenadante foi ressuspensão em tampão de Laemmli e fervido durante 5 minutos. Através de um aparelho de placa de gel em miniatura (*BioRad, Richmond, CA, EUA*), realizou-se a eletroforese em gel de sulfato de poliacrilamida dodecil de sódio. A eletrotransferência de proteínas do gel para membranas de nitrocelulose foi realizada durante 30 minutos a 30 V.

Após a transferência, uma solução de bloqueio à base de leite, foi aplicada a membrana, para reduzir ligações não específicas. Subsequentemente, as membranas foram incubadas com os anticorpos específicos:  $\alpha 7$ nAChR (*Bioss Antibodies*) (bs-1049R), STAT3 (*Santa Cruz Biotechnology*) (C:20; sc-482), pSTAT3 (*Cell Signaling Technology*) (Tyr705 D3A7, #9145) e  $\beta$ -actina (*Cell Signaling Technology*) para o controle endógeno. Após o período de incubação, os anticorpos foram removidos e as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário *Rabbit*. O sinal foi detectado por quimioluminescência (*kit ECL da Amersham*) e posterior exposição no aparelho fotodocumentador. A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria utilizando o programa *Scion Image*.

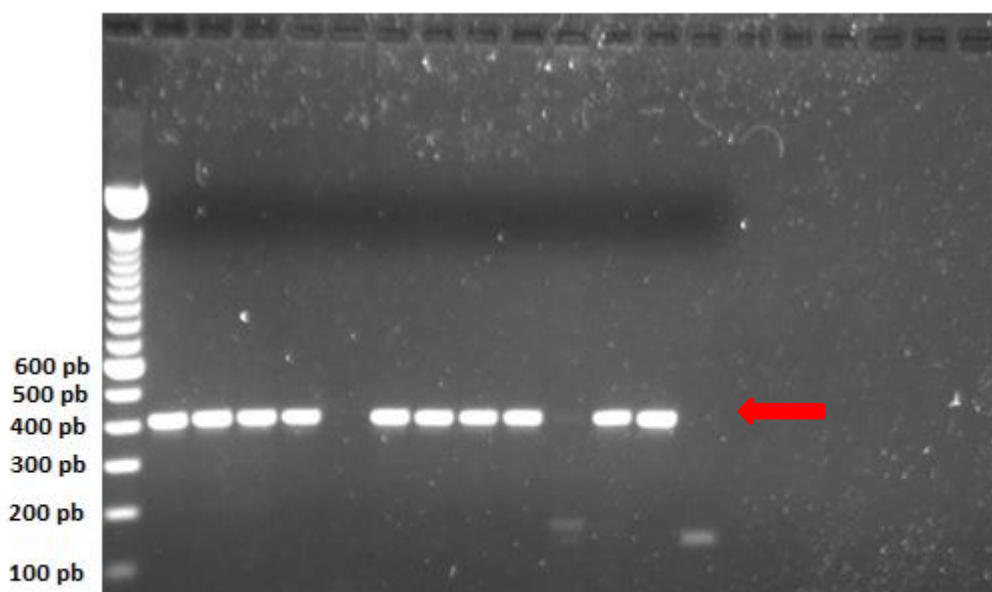
## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média. Comparações entre os grupos foram realizadas por teste t de *student* ou 2way ANOVA. Para a realização das análises estatísticas, foi utilizado o programa Prisma 7.0 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA*). As diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Genotipagem de camundongos *C57black/6* e *FAT-1*

Na análise do gel, a primeira canaleta indica o padrão molecular com *ladder* de 100 pares de base (pb), tendo o gene *fat-1* amplificação em 400 pb. As canaletas 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12 e 13, evidenciam a banda do gel de DNA, correspondente ao gene *fat-1*, enquanto que as demais canaletas representam os camundongos WT, ausentes do gene *fat-1* e/ou fragmentos amplificados (**Figura 10**).



**Figura 10. Genotipagem.** A seta indica a banda do gel de DNA que corresponde ao gene *fat-1*.

### 6.2. Camundongos *FAT-1* reduziram a incorporação de AA e aumentaram a incorporação de ácidos graxos $\omega$ -3 no plasma e no tecido cicatricial de 3 dias

Para verificar o perfil lipídico dos camundongos *FAT-1*, foram realizadas análises no plasma e no tecido não cicatricial e cicatricial, 3 dias após a indução da ferida.

Na análise de lipídios totais presentes no plasma, os camundongos transgênicos reduziram a concentração do ácido graxo AA, da família  $\omega$ -6 e aumentaram a concentração dos ácidos graxos ALA (18:3n-3), EPA (20:5n-3) e DHA (22:6n-3), todos da família  $\omega$ -3, reduzindo a proporção  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 em 32,9%, quando comparados ao grupo WT (**Figura 11A**).

No tecido cicatricial de 3 dias, através de análises da composição lipídica de diferentes classes lipídicas teciduais, verificou-se que os camundongos *FAT-1* apresentaram redução da porcentagem de AA em PC e PE e, aumento dos ácidos graxos  $\omega$ -3 DPA (22:5n-3) e DHA

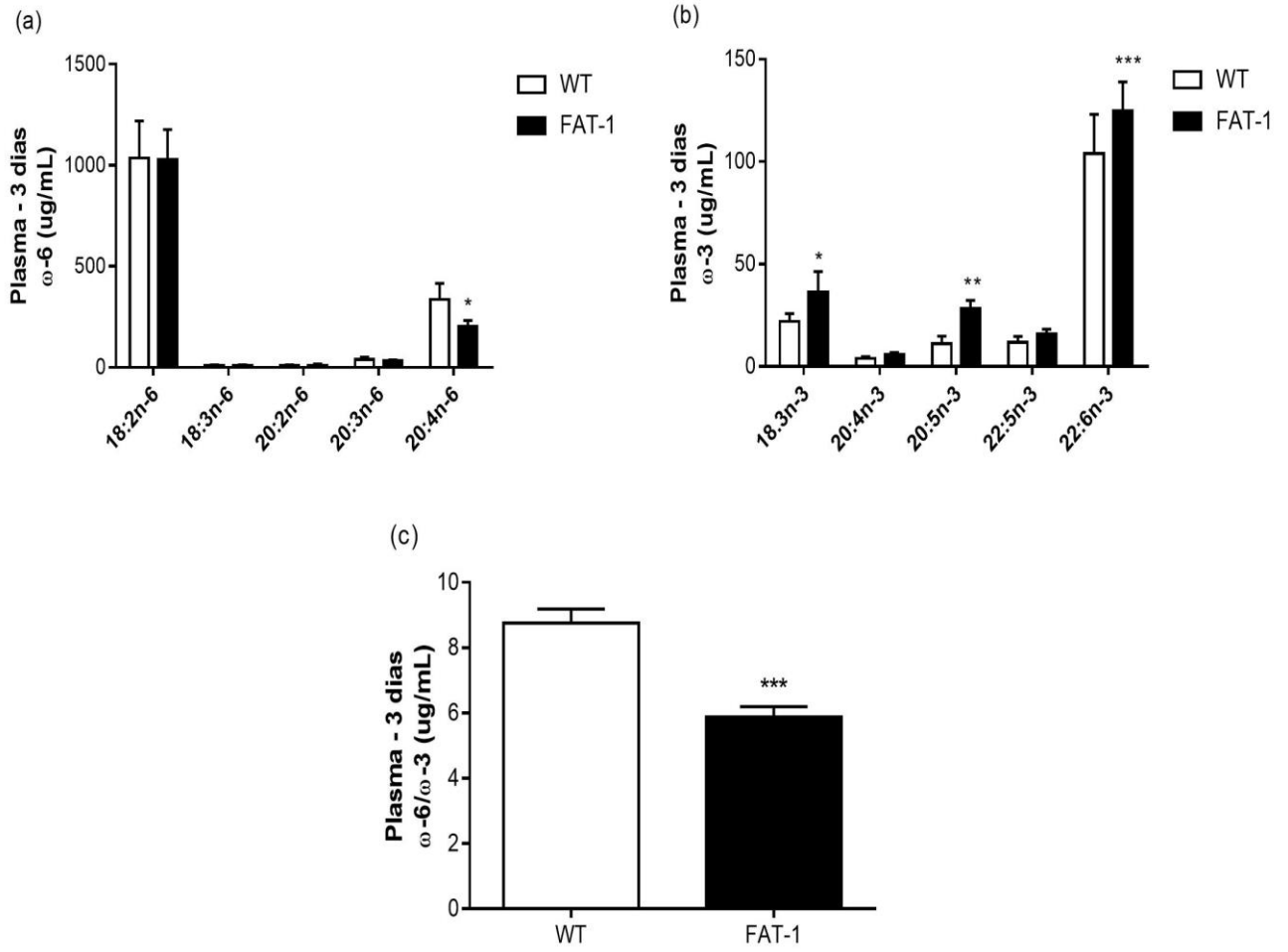
nas classes lipídicas teciduais de PC, PE e TAG, havendo ainda, um aumento do também ácido graxo  $\omega$ -3 eicosatetraenóico (ETA-20:4n-3) somente em PE. Com isto, os camundongos transgênicos obtiveram uma redução da proporção  $\omega$ -6/ $\omega$ -3, equivalente a 56,4% em PC, 55,1% em PE e 39,1% em TAG, em relação ao grupo WT (**Figura 11B à 11D**).

Na análise temporal da composição de ácidos graxos das classes lipídicas teciduais, verificou-se que em PC e PE, os camundongos *FAT-1*, apresentaram menor incorporação de ácidos graxos  $\omega$ -6 no tecido não cicatricial e cicatricial de 3 dias, em relação ao grupo WT, porém esta incorporação foi crescente, ao avaliar a incorporação entre o tecido basal e cicatricial, do mesmo grupo. Nestas mesmas classes lipídicas teciduais, os camundongos transgênicos exibiram maior incorporação de ácidos graxos  $\omega$ -3 no tecido não cicatricial e cicatricial de 3 dias, em relação ao grupo WT, contudo, esta incorporação foi decrescente, ao comparar o tecido basal e o cicatricial do mesmo grupo. Já em análise da proporção  $\omega$ -6/ $\omega$ -3, nas classes lipídicas de PC, PE e TAG, os camundongos *FAT-1* reduziram esta proporção tanto no tecido não cicatricial, quanto também no tecido cicatricial de 3 dias, em relação ao grupo WT. No entanto, ao comparar os diferentes tecidos do mesmo grupo, percebe-se um aumento gradativo da proporção  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 (**Figura 11E à 11G**).

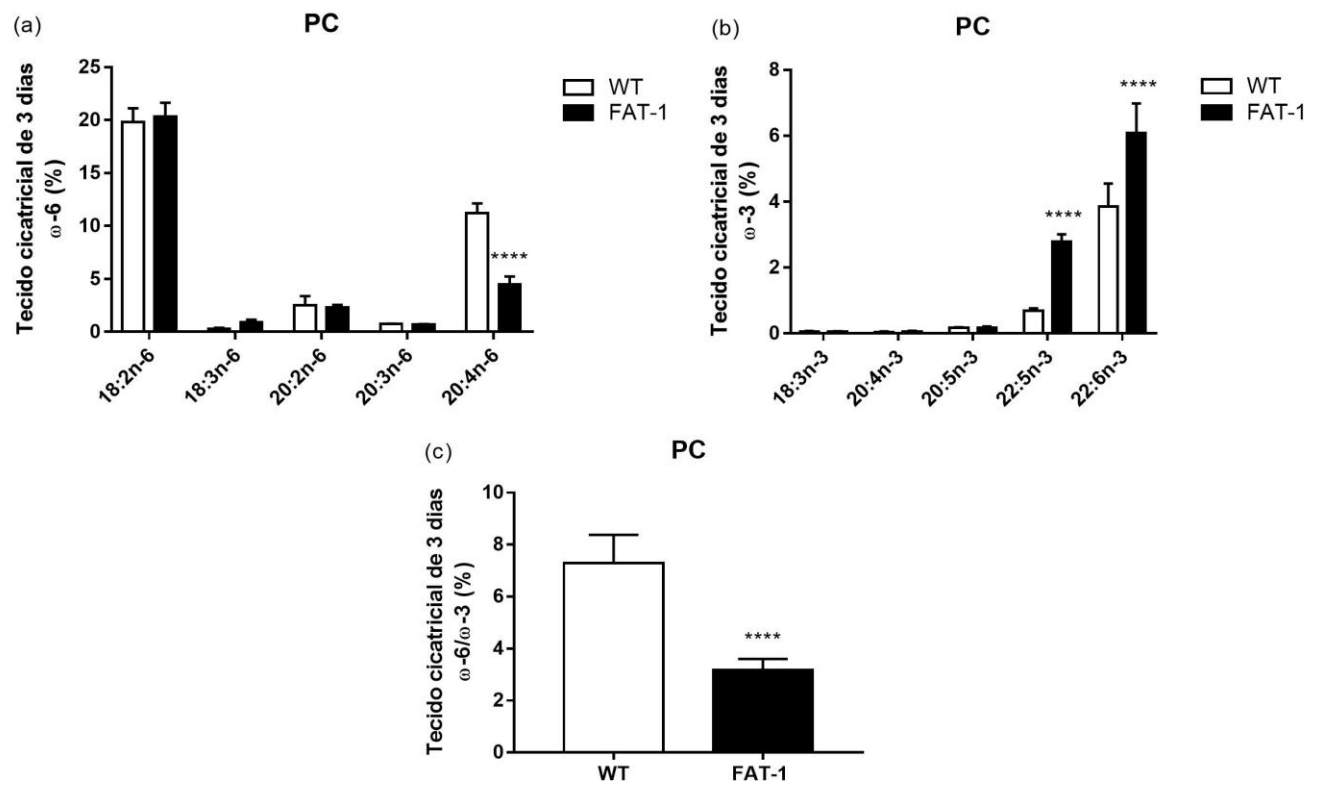
Estes resultados, comprovam o aumento da incorporação de ácidos graxos  $\omega$ -3 e a redução da proporção  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 a nível sistêmico e local, revelando que os camundongos *FAT-1* são um modelo válido para o estudo dos efeitos dos ácidos graxos poli-insaturados das famílias  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3, no processo de cicatrização de feridas.



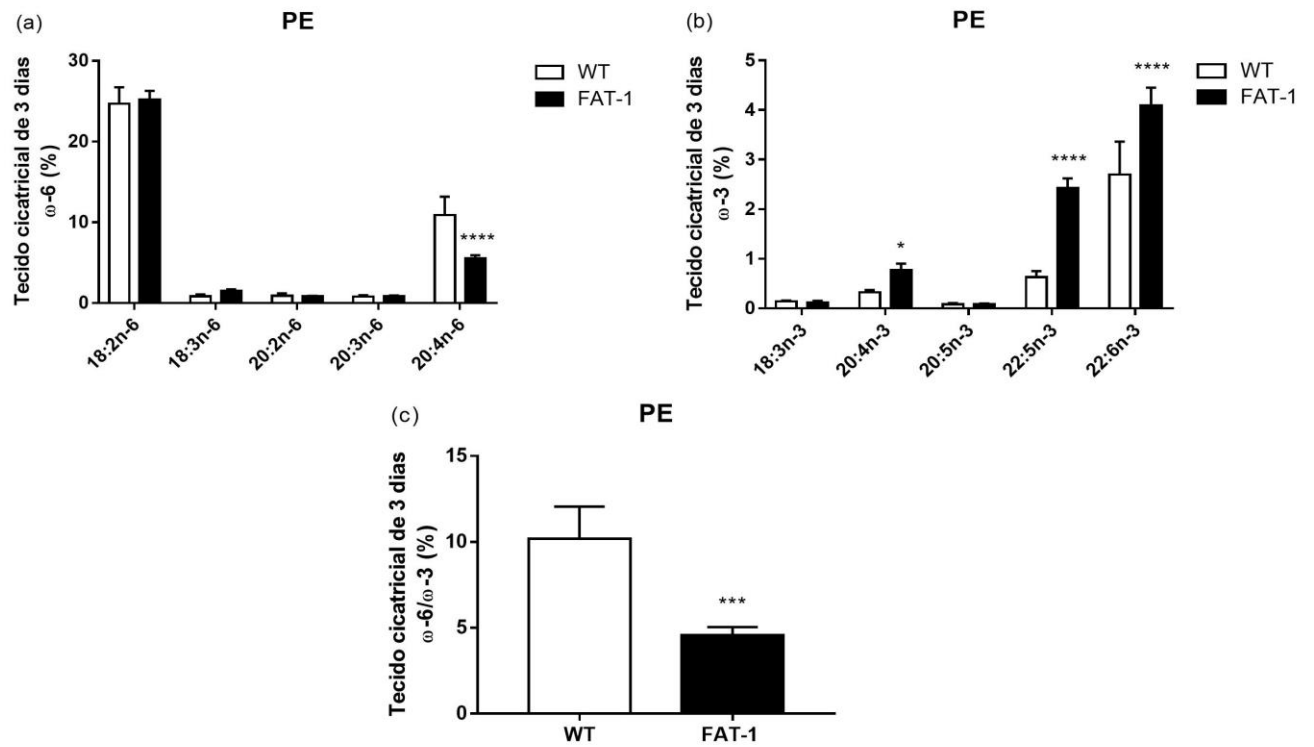
## 11A



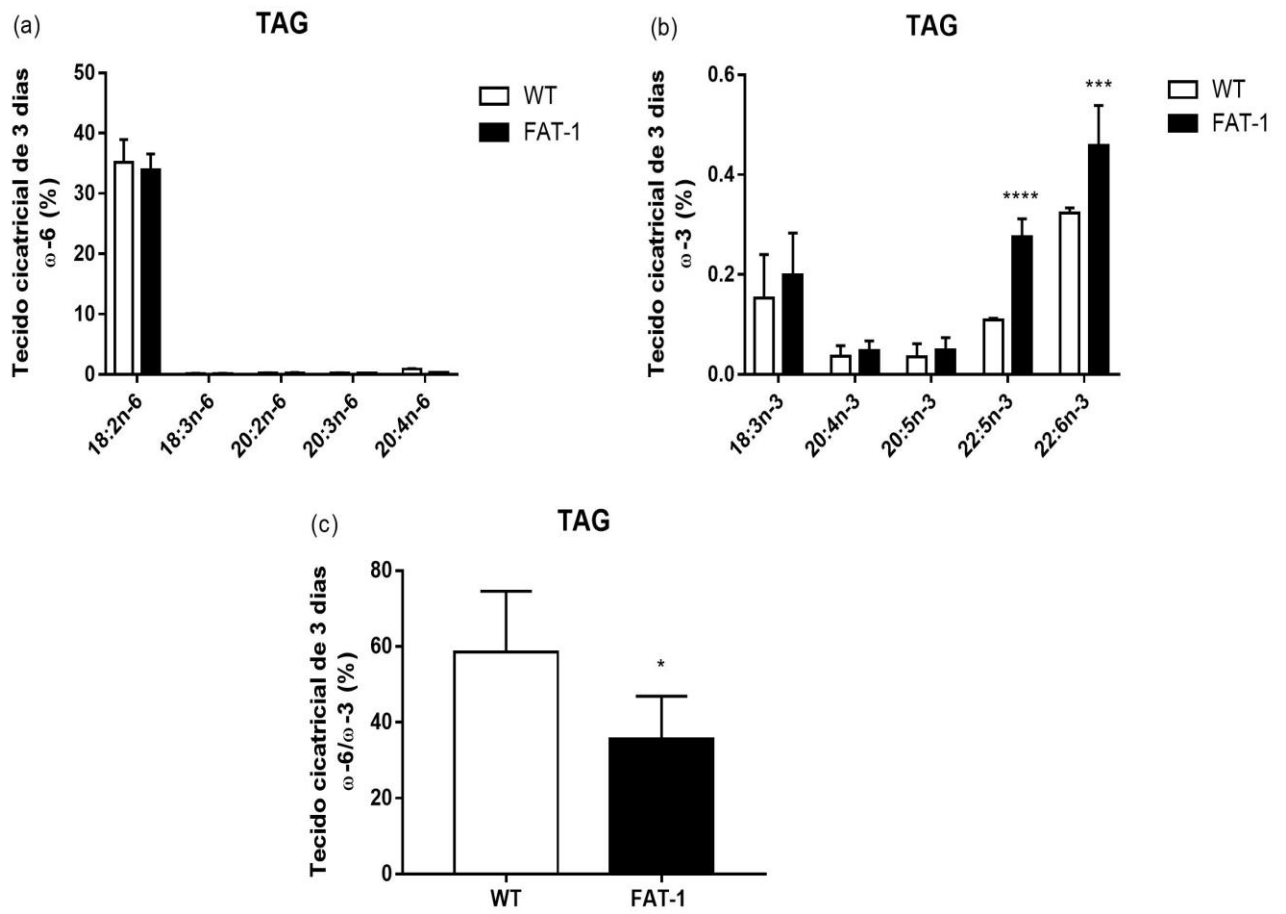
## 11B



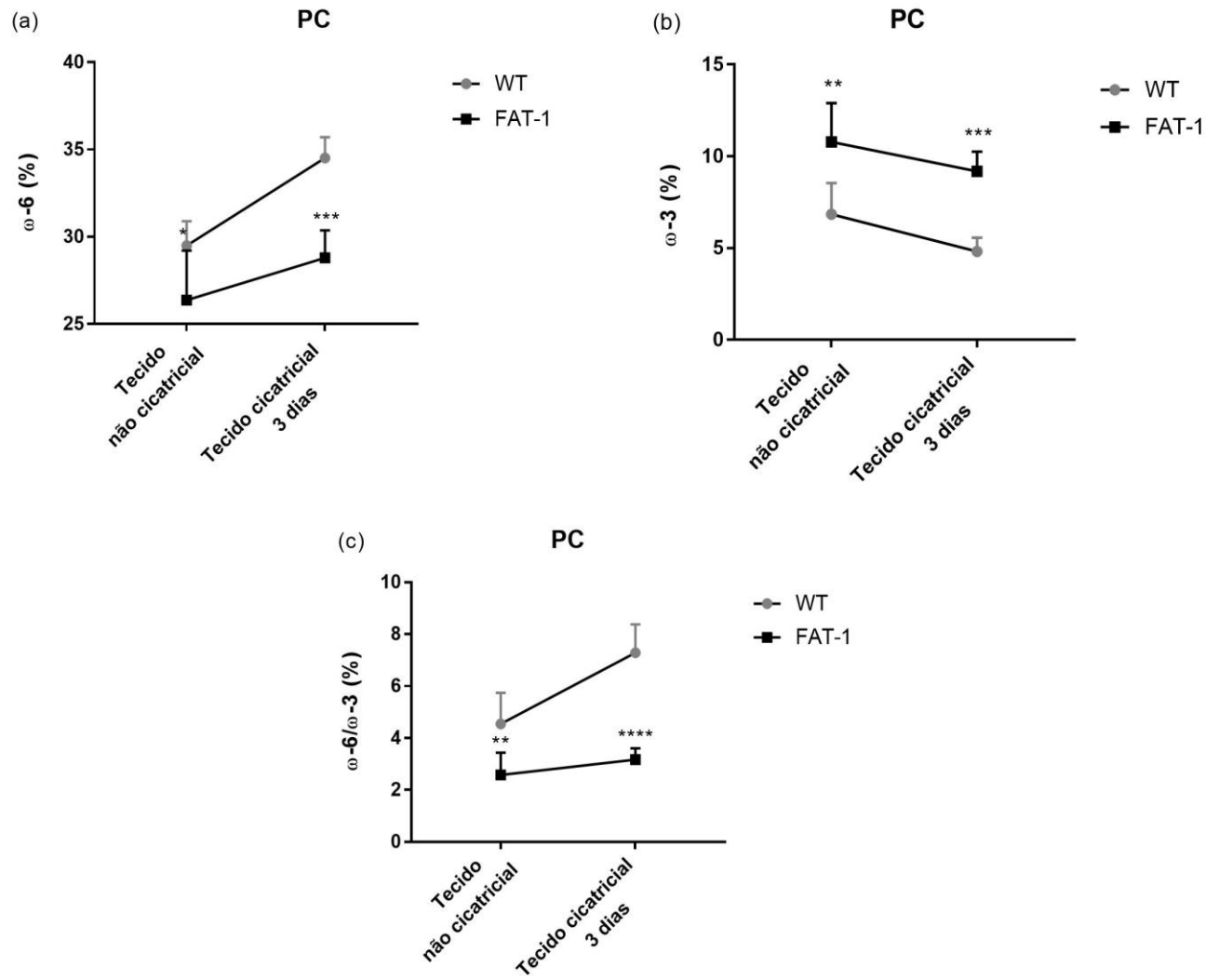
## 11C



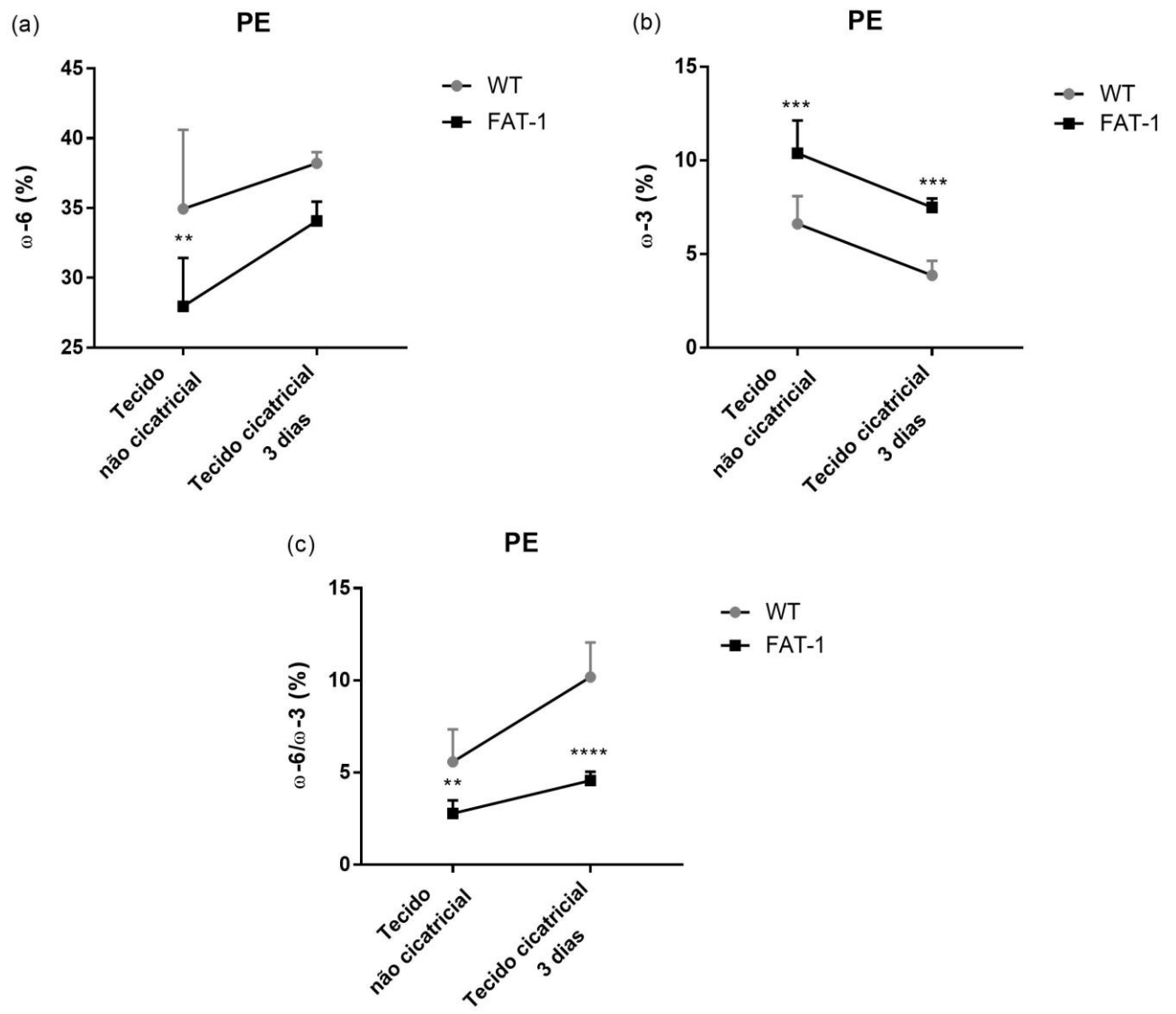
11D



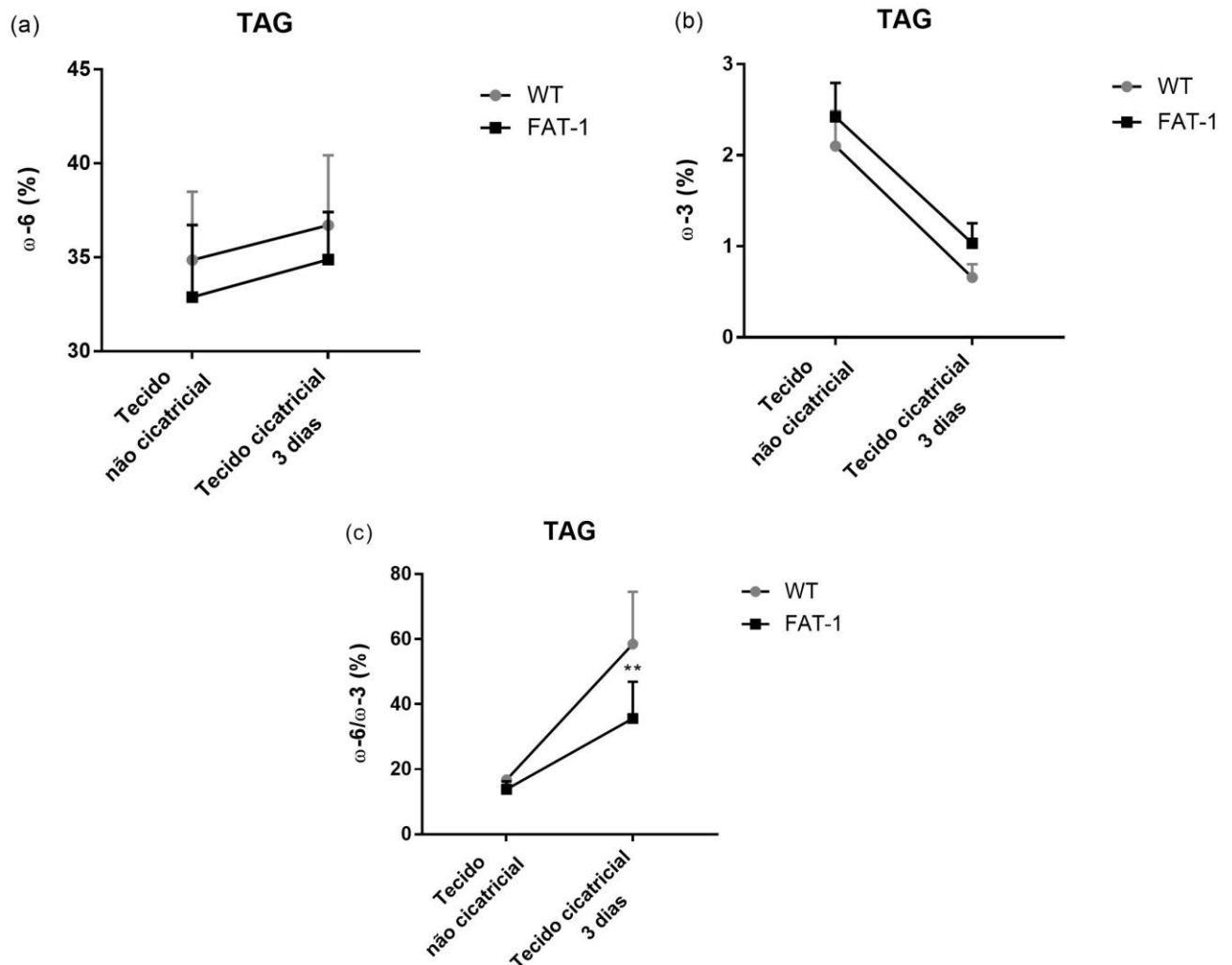
11E



11F



## 11G

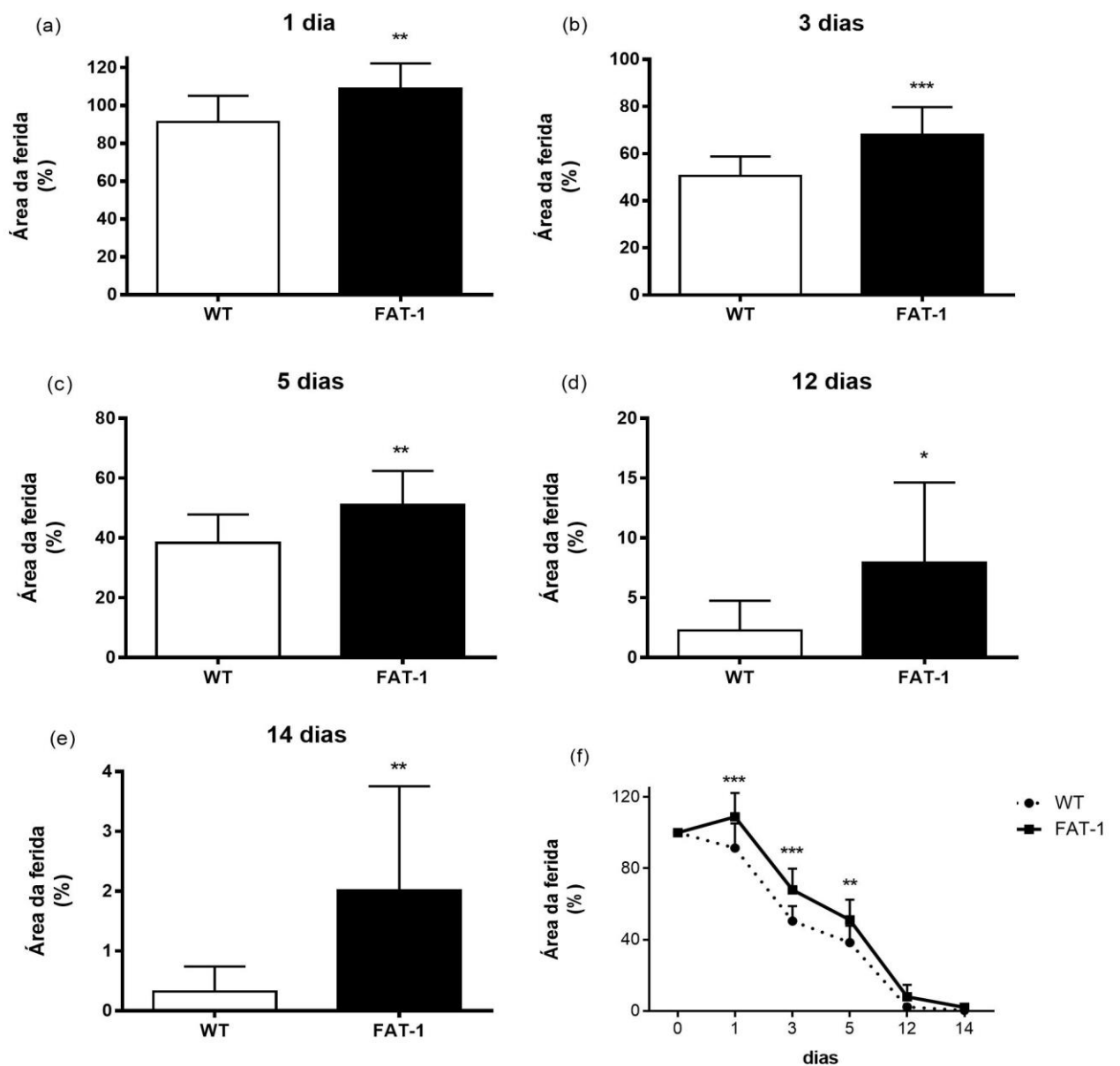


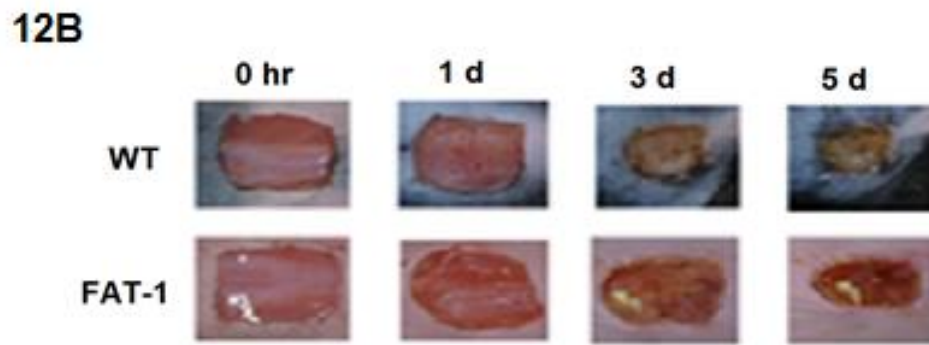
**Figura 11. Composição lipídica do plasma, do tecido não cicatricial e cicatricial de 3 dias. (11A)** Concentração de ácidos graxos  $\omega$ -6 (a),  $\omega$ -3 (b) e a proporção de ácidos graxos  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 (c) no plasma de camundongos *FAT-1* e WT, coletado 3 dias após a indução da ferida. Porcentagem de ácidos graxos  $\omega$ -6 (a),  $\omega$ -3 (b) e a proporção de ácidos graxos  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 (c) nas classes lipídicas de fosfatidilcolina (PC) (11B), fosfatidiletanolamina (PE) (11C) e triacilglicerol (TAG) (11D) do tecido cicatricial de 3 dias de camundongos *FAT-1* e WT. Análise temporal da porcentagem de ácidos graxos  $\omega$ -6 (a),  $\omega$ -3 (b) e a proporção de ácidos graxos  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 (c) nas classes lipídicas de PC (11E), PE (11F) e TAG (11G) do tecido não cicatricial e cicatricial de 3 dias de camundongos *FAT-1* e WT. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média. Diferenças significativas entre os grupos WT e *FAT-1* foram consideradas para  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) e  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).  $n = 5-10$ .

### 6.3. Camundongos *FAT-1* apresentaram atraso no fechamento da ferida

Para análise do fechamento da ferida, camundongos *FAT-1* e WT foram acompanhados durante 14 dias. Durante este período, os camundongos *FAT-1* exibiram atraso no fechamento da ferida desde o primeiro dia pós-indução. No 14º dia, a área da ferida do grupo *FAT-1* era duas vezes maior em relação à área observada no grupo WT (**Figura 12A e 12B**).

## 12A





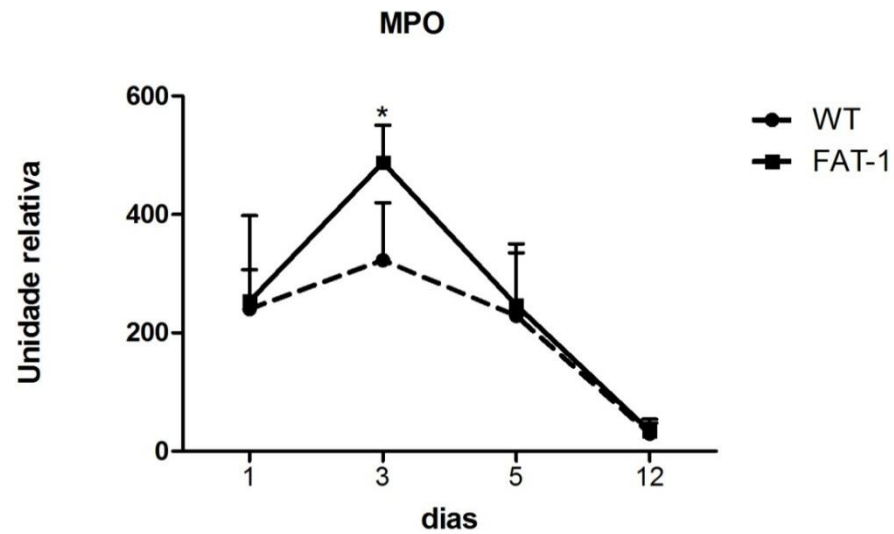
**Figura 12. Fechamento da ferida.** Análise quantitativa (12A) e figura representativa (12B) do fechamento da ferida em camundongos *FAT-1* e WT. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média. Diferenças significativas entre os grupos WT e *FAT-1* foram consideradas para  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) e  $p < 0.001$  (\*\*\*).  $n = 8-16$ .

#### 6.4. Camundongos *FAT-1* aumentaram a atividade enzimática da MPO no tecido cicatricial de 3 dias

Considerando que a fase inflamatória do processo de cicatrização de feridas é determinante para a correta cicatrização, nos perguntamos se o atraso do fechamento da ferida em camundongos *FAT-1* estaria associado a uma resposta inflamatória exacerbada. Assim, para avaliar a resposta inflamatória nestes animais, primeiramente analisamos, em diferentes períodos, a atividade enzimática da MPO, a qual atua como um marcador indireto da migração de células inflamatórias.

No tecido cicatricial de 3 dias, houve um aumento da atividade da MPO pelo grupo *FAT-1* em relação ao grupo WT (**Figura 13**). O terceiro dia do processo de cicatrização de feridas compreende a fase inflamatória tardia, na qual é necessário o controle e resolução da inflamação, para que a fase de formação de tecido ou proliferação se inicie.





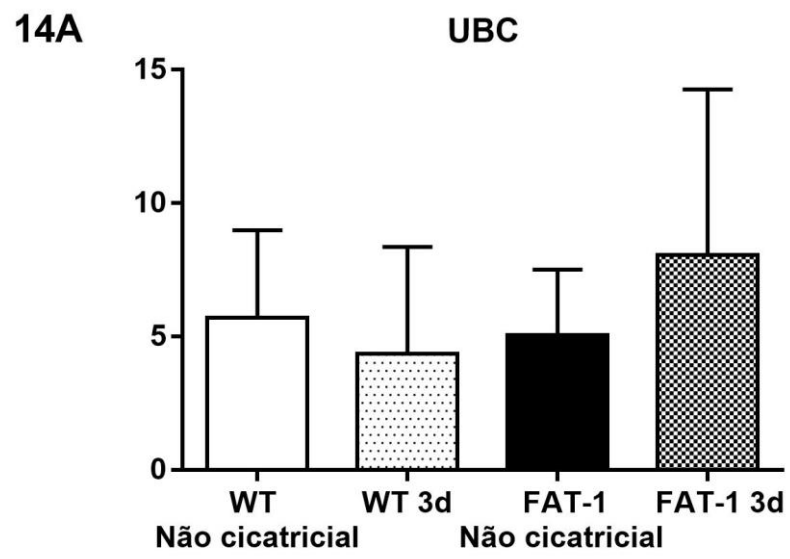
**Figura 13. Atividade enzimática da MPO.** Atividade enzimática da MPO foi analisada no tecido cicatricial de camundongos *FAT-1* e WT. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média. (\*) indica diferença estatisticamente significativa entre WT e *FAT-1* para  $p < 0.05$ .  $n = 4-6$ .

### 6.5. Camundongos *FAT-1* aumentaram a expressão gênica dos marcadores celulares CD206 e CD280

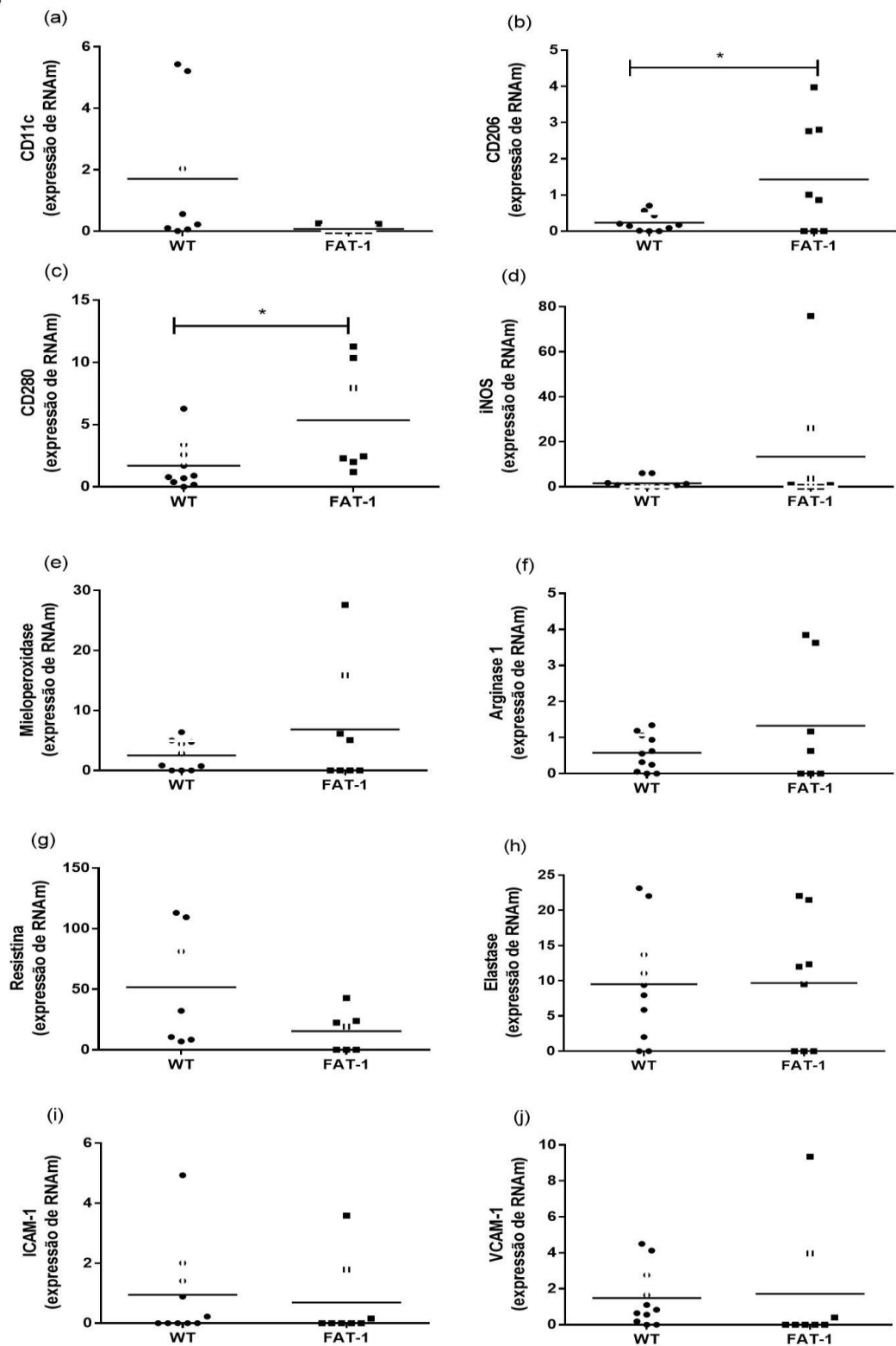
Para caracterizar as populações celulares presentes no local lesionado, avaliamos a expressão gênica de marcadores celulares no tecido cicatricial de 3 dias.

Camundongos *FAT-1* e WT modularam a expressão gênica dos controles endógenos: B2M, Hrpt, YWHAZ,  $\beta$ -actina e HMBS, no tecido não cicatricial e cicatricial de 3 dias, sendo a maioria destes genes, não amplificado. Assim, determinou-se o UBC como *housekeeping*, uma vez que este foi inalterado entre os grupos, nos tempos considerados (**Figura 14A**).

Os camundongos transgênicos aumentaram a expressão gênica dos marcadores CD206 e CD280, os quais são representativos de macrófagos anti-inflamatórios do tipo M2 (**Figura 14B**).



14B



**Figura 14. Análise da expressão gênica por PCR em tempo real.** Tecidos não cicatriciais e cicatriciais de 3 dias, de camundongos *FAT-1* e WT, foram coletados para

determinação do *housekeeping* (**14A**). Análise dos marcadores celulares foi realizada, por PCR tempo real, no tecido cicatricial de 3 dias em ambos os grupos (**14B**). Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média. (\*) indica diferença estatisticamente significativa entre WT e *FAT-1* para  $p < 0.05$ .  $n = 9-11$ .

#### **6.6. Camundongos *FAT-1* aumentaram a produção de mediadores pró-inflamatórios e reduziram a concentração de importante citocina anti-inflamatória**

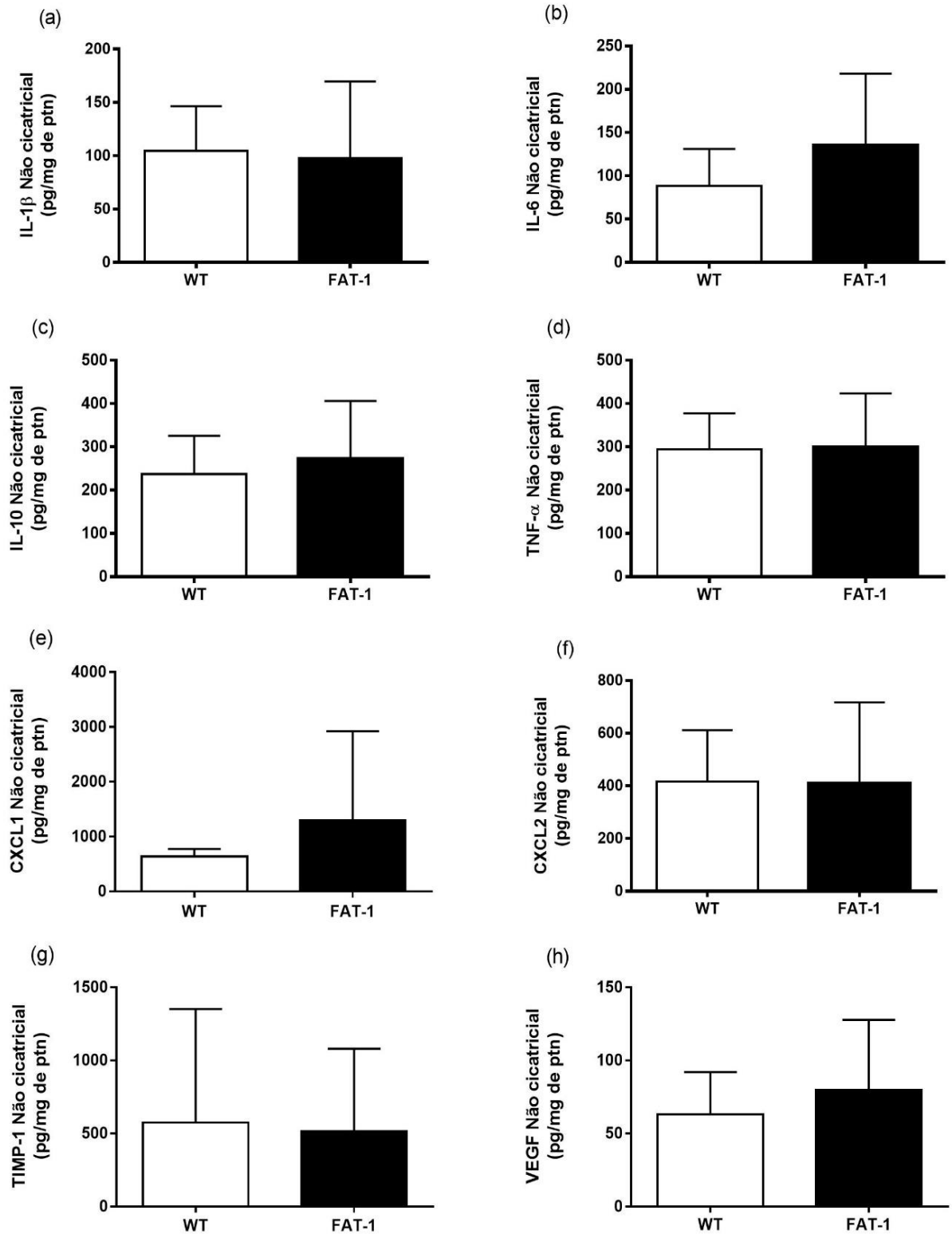
Até o momento, verificamos que há uma maior infiltração de células inflamatórias no tecido cicatricial de 3 dias e que macrófagos M2 são células predominantes neste tecido. Contudo, para caracterizar o perfil inflamatório neste tecido, é necessário avaliar quais mediadores estão sendo produzidos nesta fase inflamatória tardia. Para isto, quantificou-se a produção dos mediadores: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , CXCL1, CXCL2, TIMP-1 e VEGF.

No tecido não cicatricial, não houve diferença estatisticamente significativa na produção destes mediadores inflamatórios, entre o grupo *FAT-1* e WT (**Figura 15A**), sugerindo que os camundongos transgênicos não possuem alterações imunológicas numa condição basal. No entanto, no tecido cicatricial de 3 dias, camundongos *FAT-1* aumentaram a produção de IL-6, CXCL1, CXCL2, TIMP-1 e VEGF e reduziram a produção de IL-10, sendo a produção de outros mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , semelhante em ambos os grupos (**Figura 15B**).

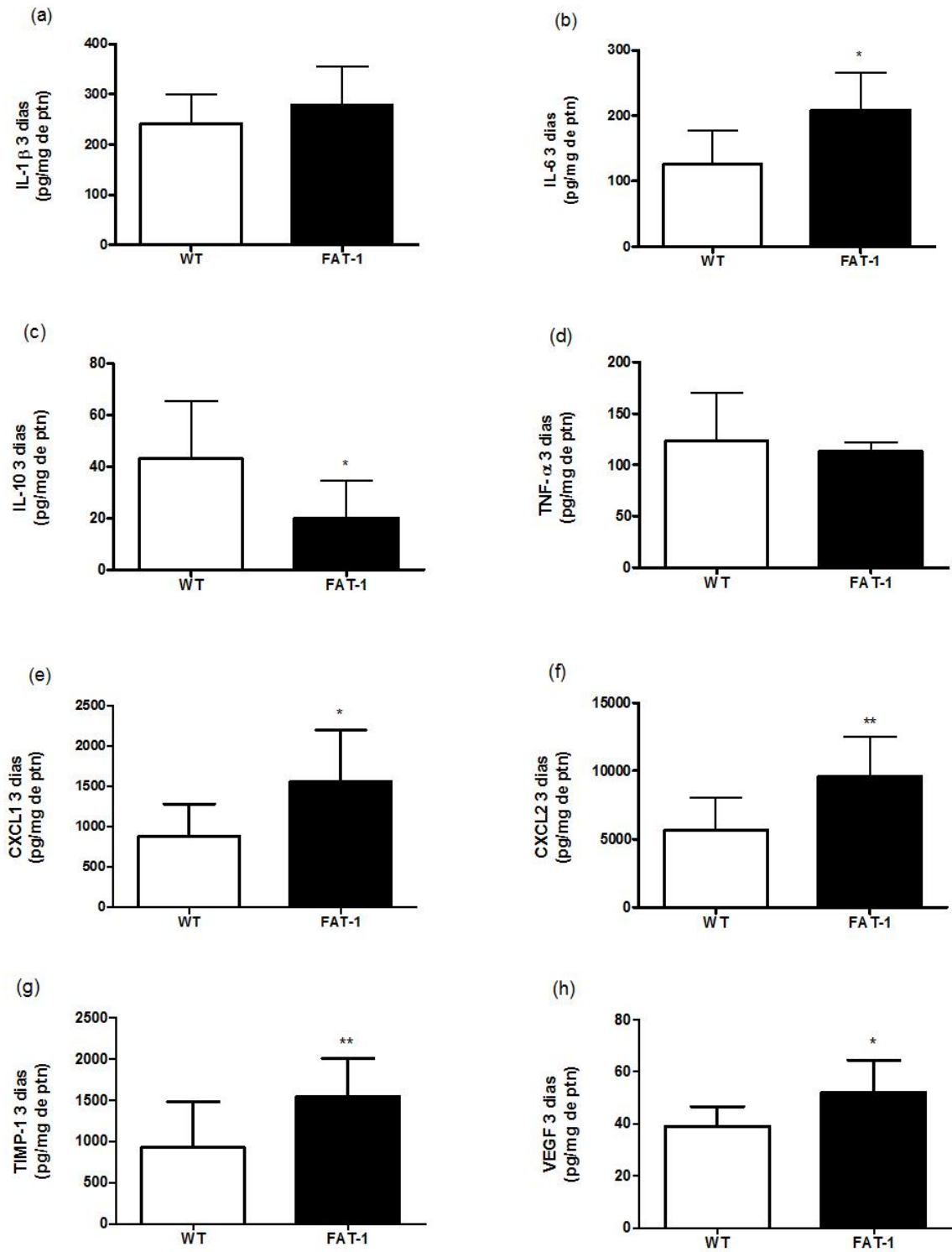
Ao compararmos a produção destes mediadores entre o tecido não cicatricial e cicatricial de 3 dias, de cada grupo isoladamente, verificamos que ambos os grupos aumentaram a produção de IL-1 $\beta$  e CXCL2 e reduziram IL-10 e TNF- $\alpha$ , tendo ainda somente o grupo *FAT-1*, aumentado a produção de TIMP-1 (**Figura 15C**), o que confirma que a realização da ferida gera uma resposta inflamatória.

O desequilíbrio na produção destes mediadores pode minimizar ou exacerbar a resposta inflamatória. Assim, estes resultados sugerem que os camundongos *FAT-1* intensificaram a inflamação, prejudicando o término da resposta inflamatória e o início das fases seguintes do processo.

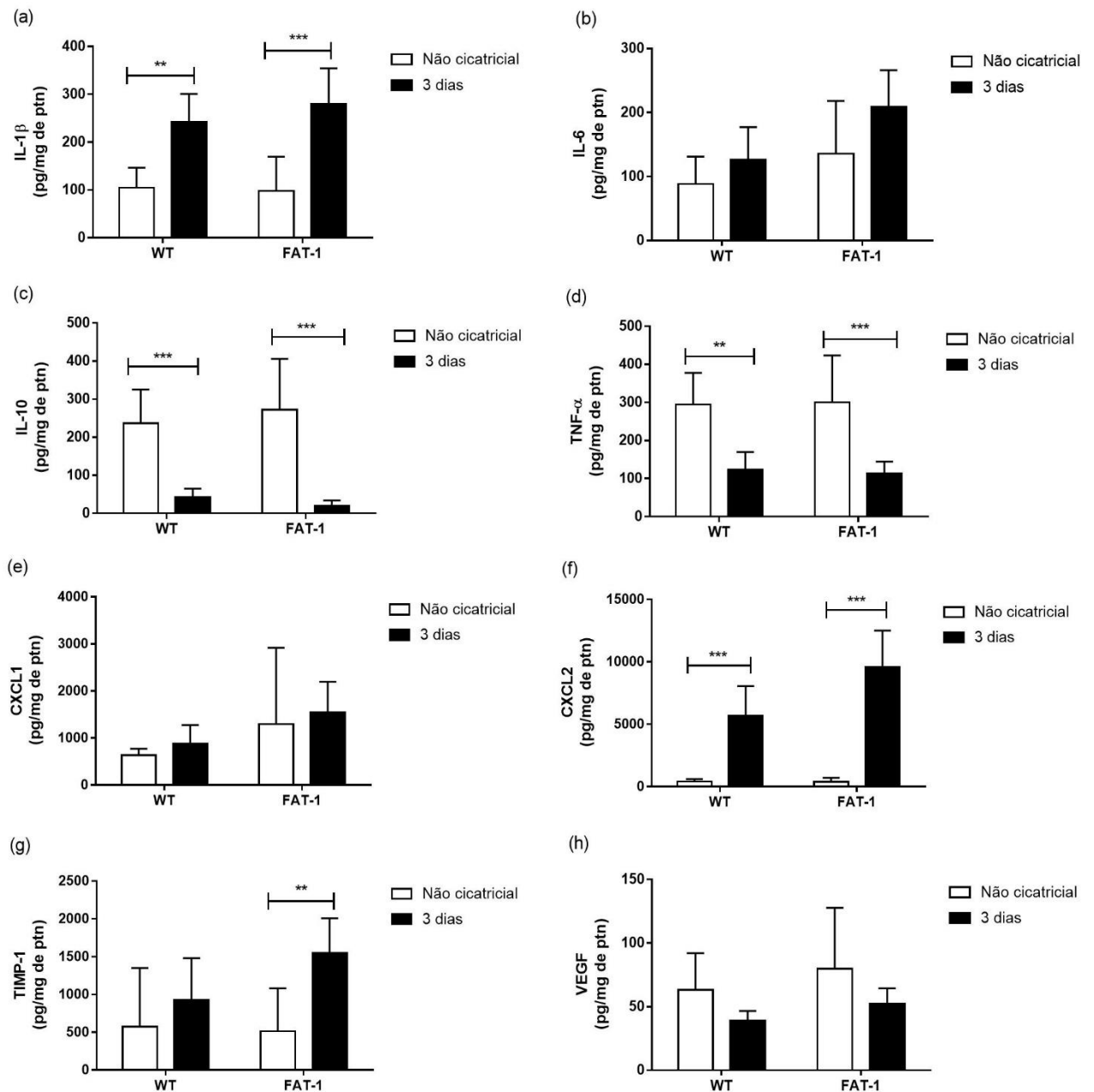
## 15A



## 15B



15C



**Figura 15. Quantificação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento.** A produção de: a) IL-1 $\beta$ , b) IL-6, c) IL-10, d) TNF- $\alpha$ , e) CXCL1, f) CXCL2, g) TIMP-1 e h) VEGF, foi avaliada no tecido não cicatricial (15A) e cicatricial de 3 dias (15B) de camundongos *FAT-1* e WT. Comparações entre a produção dos mediadores foram realizadas entre o tecido não cicatricial e cicatricial de 3 dias, de cada grupo (15C). Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média. Diferenças significativas entre os grupos WT e *FAT-1* foram consideradas para  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) e  $p < 0.001$  (\*\*\*).  $n = 8-12$ .

### 6.7. Camundongos *FAT-1* alteraram a expressão de genes envolvidos no processo de cicatrização de feridas

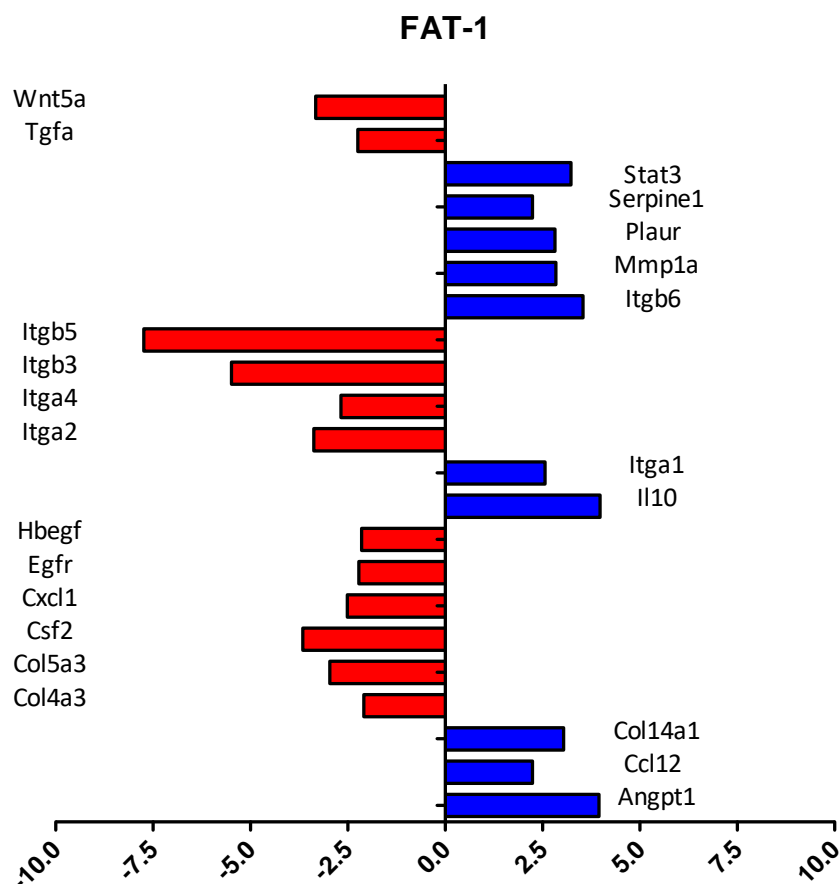
Buscando compreender a modulação da resposta inflamatória pelos camundongos *FAT-1*, analisamos a expressão de genes envolvidos no processo de reparo tecidual, através da técnica de PCR-array específico para cicatrização de feridas.

Camundongos *FAT-1* aumentaram a expressão de STAT3 e de genes relacionados a ativação/inibição do plasminogênio de tecido e uroquinase, tais como o inibidor de serina ou cisteína proteinase, clade E, membro 1 (*Serpine1*) e o receptor do ativador de plasminogênio tipo uroquinase (*Plaur*). Genes como metaloproteinase de matriz 1a (*MMP1a*), colágeno tipo XIV alfa 1 (*Col14a1*) e angiopoetina 1 (*Angpt1*), essenciais para o remodelamento tecidual e aporte sanguíneo, também tiveram a expressão aumentada, bem como IL-10, ligante 12 de quimiocina (*Ccl12*) e integrina beta-6 (*Itgb6*) e integrina alfa-1 (*Itga1*), componentes da família das integrinas (**Figura 16**).

Em contraste, outros genes também pertencentes à família das integrinas, tais como *Itgb5*, *Itgb3*, *Itga4* e *Itga2*, foram negativamente expressos. Entre estes, a expressão de *Itgb5* foi reduzida 7,5 vezes. Adicionalmente, os camundongos *FAT-1* inibiram a expressão de fatores de crescimento epidérmicos como: TGF- $\alpha$ , fator de crescimento epidérmico ligado a heparina (HB-EGF) e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), assim como, exibiram uma expressão reduzida de *Col5a3*, *Col4a3*, *Wnt5a*, *CXCL1* e do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (*CSF2*), importantes para a proliferação, migração e adesão celular (**Figura 16**).

Todos estes dados, revelam que diversos genes importantes para uma reparação tecidual efetiva foram modulados pelo grupo *FAT-1*.





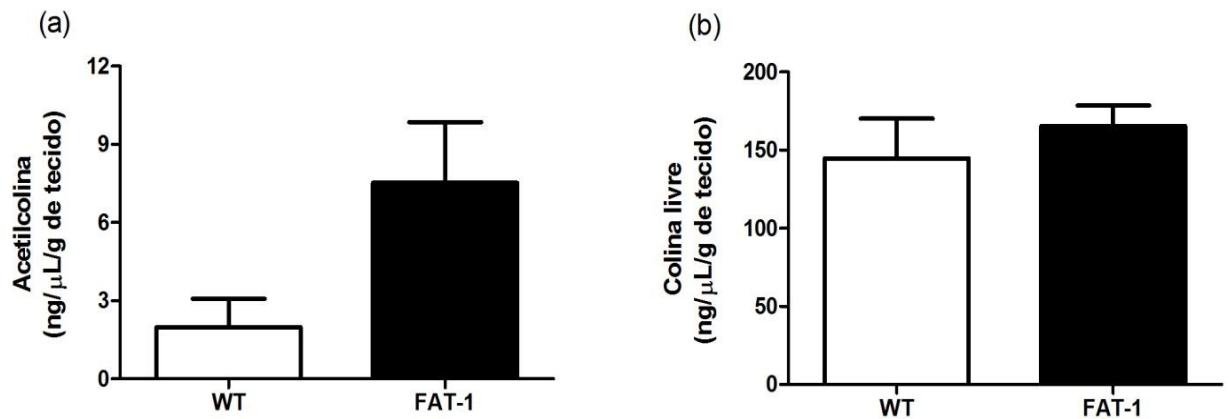
**Figura 16. PCR-array específico para cicatrização de feridas.** Tecidos cicatriciais de camundongos *FAT-1* e WT foram coletados 3 dias após a indução da ferida. A linha vertical indica o controle, sendo os genes representados pelas barras azuis, positivamente expressos e, os genes representados pelas barras vermelhas, negativamente expressos. n = 3 animais por grupo.

#### 6.8. Camundongos *FAT-1* não alteraram a produção de ACh e colina livre

A resposta inflamatória exacerbada, assim como, sua influência na modulação de genes necessários a formação de tecido novo, prejudicou o fechamento da ferida. Muitas vias são responsáveis pelo controle desta inflamação, e algumas delas podem ser moduladas por ácidos graxos  $\omega$ -3.

Para verificar se a via anti-inflamatória colinérgica é um dos mecanismos pelos quais ácidos graxos  $\omega$ -3 atuam, influenciando a resposta inflamatória, quantificamos colina livre e ACh, no tecido cicatricial de 3 dias de camundongos *FAT-1* e WT. A ACh é o principal

neurotransmissor envolvido na ativação da via anti-inflamatória colinérgica e mudanças em sua concentração, podem afetar esta ativação e a funcionalidade da via. Em ambos os grupos, não houve diferença estatisticamente significativa na produção de ACh e colina livre, embora no grupo *FAT-1*, haja uma tendência em aumentar a produção de ACh (**Figura 17**).

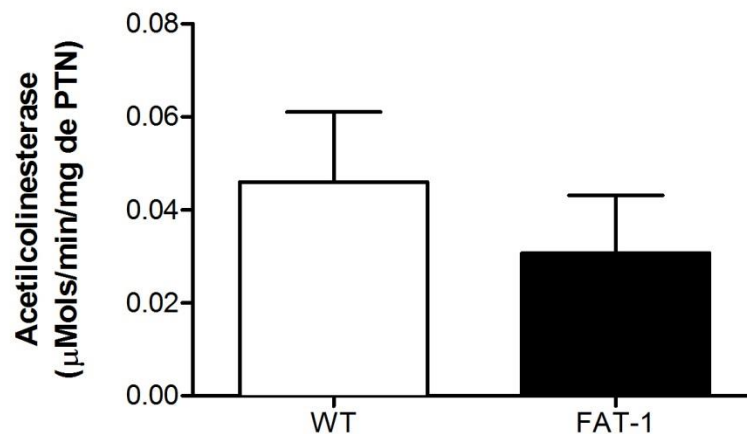


**Figura 17. Quantificação de ACh e colina livre.** Tecido cicatricial de 3 dias foi coletado de camundongos *FAT-1* e WT e analisados imediatamente por método colorimétrico. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média. (a)  $p = 0.1017$ ; (b)  $p = 0.4297$ .  $n = 3-8$ .

### 6.9. Camundongos *FAT-1* não alteraram a atividade enzimática da AChE

AChE é uma enzima envolvida na degradação de ACh, em colina livre e acetato, quando esta não está ligada ao receptor.

O resultado revela que a atividade enzimática da AChE não foi alterada nos grupos *FAT-1* e WT (**Figura 18**), indicando que não há comprometimento na ativação da via no ambiente extracelular.



**Figura 18. Atividade enzimática da AChE.** Tecidos cicatriciais de camundongos *FAT-1* e WT foram coletados 3 dias após a indução da ferida e imediatamente analisados. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média.  $p = 0.1334$ .  $n = 4-6$ .

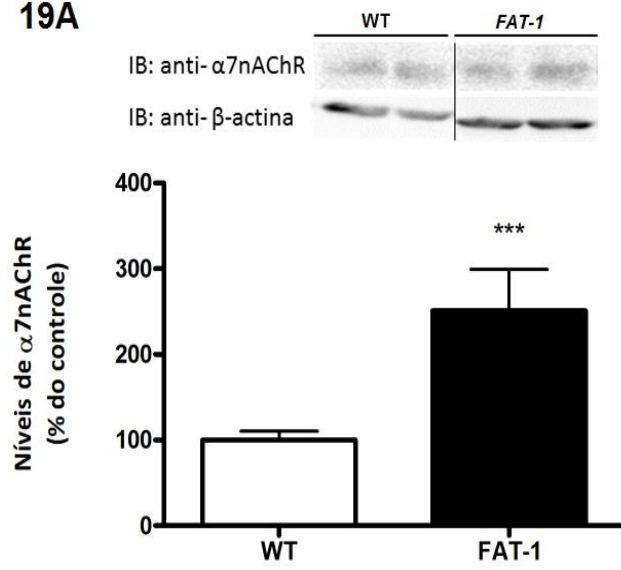
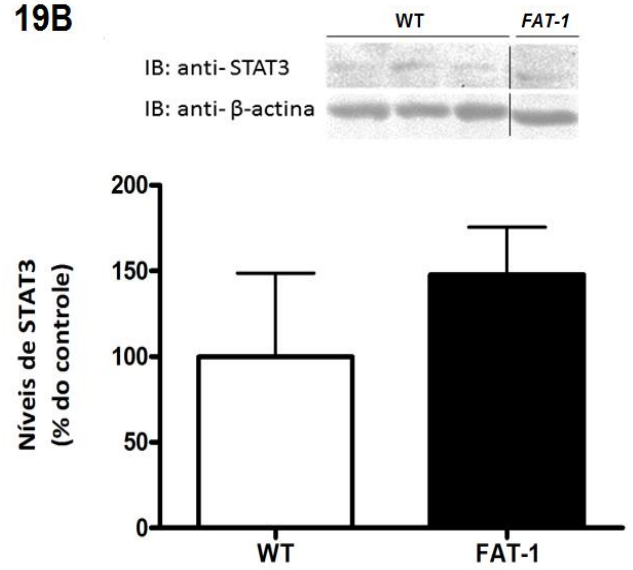
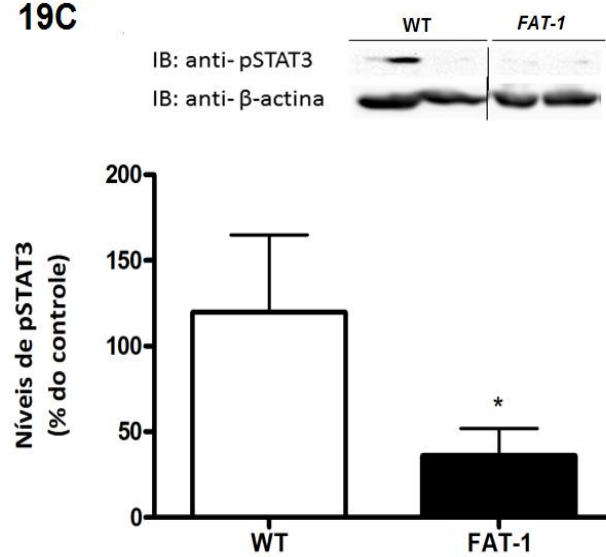
#### 6.10. Camundongos *FAT-1* aumentaram a expressão da proteína $\alpha 7$ nAChR e reduziram pSTAT3

A ACh ativa a via anti-inflamatória colinérgica, através da ligação com o receptor  $\alpha 7$ nAChR. Devido a isto, analisamos a expressão proteica do receptor  $\alpha 7$ nAChR no terceiro dia após a indução da ferida.

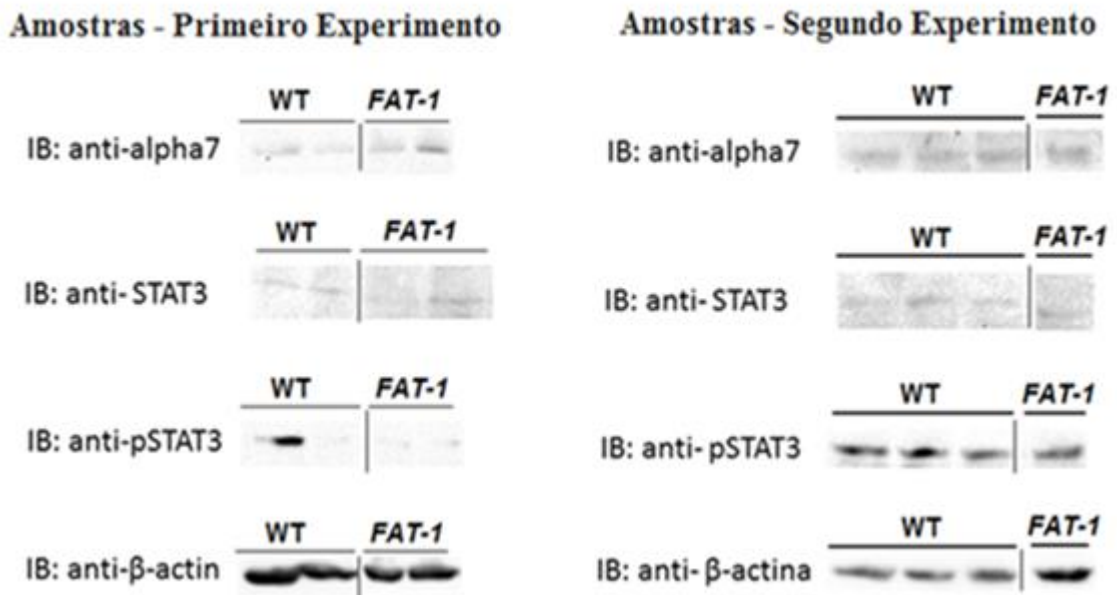
Os camundongos *FAT-1* aumentaram a expressão da proteína  $\alpha 7$ nAChR (**Figura 19A**). Este resultado indica que a ativação da via pode estar otimizada no grupo transgênico. Contudo, isto contradiz ao perfil pró-inflamatório evidenciado neste grupo, uma vez que, quando a via é ativada, existe um controle da inflamação.

O receptor  $\alpha 7$ nAChR quando ativado, fosforila (ativa) STAT3, que irá então, regular a transcrição e a expressão gênica de mediadores inflamatórios. Entretanto, a expressão proteica de pSTAT3 foi reduzida pelo grupo *FAT-1*, sendo STAT3 total, inalterada entre os grupos (**Figuras 19B e 19C**). Estes resultados revelam um mecanismo de bloqueio, que impede a fosforilação de STAT3 e consequentemente a ação anti-inflamatória da via colinérgica.

Todos estes resultados de *western blotting*, foram realizados em dois dias de experimento, com diferentes amostras em cada dia (**Figura 19D**).

**19A****19B****19C**

19D



**Figura 19. Análise da expressão proteica da  $\alpha 7$ nAChR, STAT3 total e pSTAT3.**

Tecidos cicatriciais de camundongos *FAT-1* e WT foram coletados no terceiro dia após a indução da ferida e utilizados imediatamente para análise da expressão das proteínas:  $\alpha 7$ nAChR (19A), STAT3 total (19B) e pSTAT3 (19C). Para normalização dos resultados, utilizou-se o controle endógeno  $\beta$ -actina. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média. Diferenças significativas entre os grupos WT e *FAT-1* foram consideradas para  $p < 0.05$  (\*) e  $p < 0.001$  (\*\*\*).  $n = 3-5$  (19D).

## 7. DISCUSSÃO

A cicatrização de feridas é um processo fisiológico natural e complexo, essencial para a restauração da homeostasia e função tecidual. A inflamação corresponde à primeira fase deste processo e alterações na intensidade e duração desta resposta inflamatória, podem interferir no início das próximas fases e consequentemente na correta cicatrização [19].

Uma resposta inflamatória anormal e persistente, não só prejudica o reparo tecidual frente a uma lesão, como também é um fator determinante para o surgimento e cronicidade de diversas doenças da atualidade, como por exemplo, doenças cardiovasculares, obesidade, câncer e diabetes. Pensando nisto, diversos mecanismos de controle da inflamação têm sido estudados, dentre eles, a função dos ácidos graxos poli-insaturados.

Ácidos graxos poli-insaturados da família  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 são hoje, foco de estudos de pesquisas destinadas ao entendimento da inflamação. A mudança no perfil dietético do consumo de ácidos graxos  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 proporcionou em curto tempo, um aumento da proporção de ácidos graxos essenciais  $\omega$ -6 para  $\omega$ -3, ocasionando uma adaptação genética, na qual todos os mamíferos perderam a capacidade de converter ácidos graxos  $\omega$ -6 em  $\omega$ -3 [52]. Como resultado, uma alta proporção de  $\omega$ -6 para  $\omega$ -3 existe em nossos tecidos, o que contribui para o surgimento e prevalência de doenças crônicas e inflamatórias. No entanto, embora seja reconhecido que a redução da proporção  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 é desejável para o controle da inflamação, não existem estudos que comprovem a razão ideal para se obter tais benefícios [52-53]. Devido a isto, pesquisas têm utilizado um modelo de camundongo transgênico denominado *FAT-1*, o qual contém o gene *fat-1*, responsável por converter ácidos graxos  $\omega$ -6 em  $\omega$ -3 endógeno, em organismos primatas [25]. Estes camundongos transgênicos possuem uma redução da proporção  $\omega$ -6/ $\omega$ -3, permitindo a investigação das propriedades biológicas de ácidos graxos  $\omega$ -3, sem considerar a incorporação destes ácidos graxos vindos da dieta, representando uma estratégia confiável [54].

Assim, buscando compreender as funções dos ácidos graxos  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 na fase inflamatória tardia do processo de cicatrização de feridas, utilizamos os camundongos *FAT-1* como modelo de estudo.

Através de análises por cromatografia gasosa, verificamos que a produção endógena de ácidos graxos  $\omega$ -3 pelos camundongos transgênicos, confirmou-se pelo aumento da concentração de ALA, EPA e DHA no plasma e, da porcentagem de ETA, DPA e DHA, nas classes lipídicas de PC, PE e TAG, do tecido cicatricial coletado três dias após a indução da ferida. Tanto no plasma, quanto no tecido cicatricial, os camundongos *FAT-1* reduziram a proporção de ácidos graxos  $\omega$ -6/ $\omega$ -3. Esta redução, deveu-se principalmente à diminuição do

ácido graxo AA, pertencente à família de ácidos graxos  $\omega$ -6 e o qual atua como influente mediador pró-inflamatório [55].

Um estudo demonstrou, que a administração de óleo de peixe rico em EPA e DHA, modulou os níveis de lipídios endógenos e a produção de seus respectivos metabólitos no plasma, favorecendo a cicatrização de feridas intestinais, no modelo de doença inflamatória intestinal. Neste estudo, verificou-se que a suplementação com ácidos graxos  $\omega$ -3, aumentou os níveis de AA e DHA no início do processo de cicatrização, os quais foram gradativamente reduzidos. Entretanto, verificou-se que o AA reduziu drasticamente no início da inflamação, o que associou-se ao aumento das prostaglandinas F1alfa (PGF1 $\alpha$ ) e F2alfa (PGF2 $\alpha$ ) e de seus metabólitos, o ácido 19R-tetrahidroxi-13E-prostaenóico (19H-PGF1 $\alpha$ ) e o ácido 20-tetrahidroxi-5Z, 13E-prostadienóico (20H-PGF2 $\alpha$ ). Estes metabólitos pró-inflamatórios, voltaram a condição basal na inflamação tardia. Já os níveis de DHA, também reduziu no início do processo inflamatório, porém teve uma redução drástica na inflamação final, o que também associou-se com o aumento da resolvina D1 (RvD1), sugerindo um link entre o uso do precursor e a síntese do seu metabólito [55]. Correlacionando a este estudo, um outro grupo de pesquisadores, demonstrou que no modelo de cicatrização de feridas cutâneas crônicas, eicosanóides derivados do ácido graxo AA, encontraram-se elevados em todo o processo [56]. Estes resultados, supõe que para que haja um controle da inflamação, é necessário que os níveis de lipídios endógenos estejam coordenados com as diferentes fases da resposta inflamatória, o que sugere que os camundongos *FAT-1*, podem ter um descontrole do processo inflamatório, devido aos níveis reduzidos de AA e aumentados de DHA e demais ácidos graxos  $\omega$ -3, no tempo de três dias, referente a fase inflamatória tardia.

Contraditoriamente a estes achados literários, um estudo verificou que em amostras teciduais de feridas hipertróficas humanas, havia um aumento significativo do ácido graxo AA nos fosfolipídios, o qual foi associado à cicatrização deficiente [57]. Deste modo, mais estudos são necessários para comprovar a relação entre a composição lipídica e os derivados eicosanóides, no processo de cicatrização de feridas.

Contudo, no presente trabalho, os camundongos *FAT-1* apresentaram dificuldade em cicatrizar, uma vez que a área da ferida destes animais, manteve-se maior desde o primeiro dia após a indução. Este fato pode estar associado, a uma modulação da resposta inflamatória tardia, avaliada no tecido cicatricial de três dias. O desequilíbrio desta resposta inflamatória promoveu ainda, a modulação de vários genes essenciais à formação e manutenção da MEC.

O aumento da atividade enzimática da MPO pelos camundongos *FAT-1*, indica uma

elevada infiltração de leucócitos no tecido lesionado, assim como, prejuízos nesta fase inflamatória. A MPO é uma peroxidase presente nos leucócitos de linhagem granulocítica e monocítica, responsável por liberar EROs, as quais estão envolvidas com a morte de bactérias, danos teciduais oxidativos e, principalmente, com a sinalização celular [58]. O aumento da atividade da MPO é implicado em diversas doenças inflamatórias e, um estudo demonstrou que leucócitos infiltrantes causaram lesões epiteliais severas, por aumentarem a atividade da MPO, bloqueando o ciclo celular das células epiteliais e consequentemente, diminuindo a migração e a proliferação, resultando na não cicatrização epitelial *in vivo* [58].

As células recrutadas junto com as residentes produzem mediadores que irão influenciar em todo o processo de cicatrização. Desta forma, a predominância dos tipos celulares é determinante para caracterizar a resposta inflamatória.

Através de PCR em tempo real, verificou-se que os camundongos *FAT-1* aumentaram a expressão dos marcadores celulares CD206 e CD280, que são representativos de macrófagos M2. Os macrófagos são células do sistema imune inato, cruciais para a regulação da inflamação, bem como processos fisiológicos, como o remodelamento tecidual. Os macrófagos possuem grande plasticidade e heterogeneidade fenotípica, adquirida em resposta a sinais inflamatórios do microambiente no qual se encontram, sendo comumente classificados como macrófagos M1 ou M2 [59]. Os macrófagos M1 dependem da ativação clássica induzida por interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) e lipopolissacarídeos (LPS). São descritos como o subtipo pró-inflamatório, por produzirem EROs, citocinas pró-inflamatórias como: interleucina-12 (IL-12), interleucina-23 (IL-23), IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 e quimiocinas, como por exemplo, CXCL2. Por outro lado, citocinas, tais como interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13) induzem uma ativação alternativa, responsável pela polarização de macrófagos M2, os quais possuem função anti-inflamatória, por expressarem níveis reduzidos de mediadores pró-inflamatórios e aumentarem a produção de IL-10 [59-60]. Uma resposta inflamatória normal depende da comutação dinâmica entre esses dois estádios de polarização, sendo os macrófagos do tipo M1, predominantes no estágio inicial da inflamação, para que patógenos sejam eliminados e para que demais células inflamatórias efetoras sejam recrutadas, de modo que, os macrófagos M2, prevalecem no estágio final da inflamação, onde são determinantes para que haja a resolução da inflamação [59,61]. No entanto, apesar dos resultados evidenciarem uma possível predominância de macrófagos M2 no tecido cicatricial de três dias, não observamos um efeito anti-inflamatório e de resolução da fase inflamatória tardia no grupo transgênico.

Os camundongos *FAT-1*, aumentaram a produção de mediadores, tais como CXCL1 e



CXCL2 e reduziram IL-10. As quimiocinas CXCL1 e CXCL2 são as principais quimiocinas expressas no sítio inflamatório, para que outras células sejam recrutadas e promovam a inflamação, sendo que níveis permanentemente elevados destas quimiocinas, atuam inibindo a reparação tecidual [62]. Por outro lado, a IL-10 é uma citocina regulatória, responsável por minimizar a produção de mediadores pró-inflamatórios e controlar a inflamação [63]. Deste modo, estes dados revelam o não controle da resposta inflamatória tardia pelos camundongos *FAT-1* e, possível cronicidade deste estágio sobre as demais fases do processo de cicatrização.

Ao que tudo indica uma predominância de macrófagos M2 no tecido cicatricial do grupo *FAT-1*, esta pode ser explicada por diversos fatores que também exercem influência sobre a polarização destes tipos celulares.

Um estudo avaliou que níveis reduzidos do ácido graxo AA nas membranas de macrófagos, influenciaram a sua polarização para o fenótipo M2 [64]. Com isto, a redução da porcentagem de AA nas classes lipídicas teciduais de PC, PE e TAG dos camundongos transgênicos, pode ter induzido ao aumento destas células no tecido. Adicionalmente, ácidos graxos da família  $\omega$ -3 também promovem a ativação de macrófagos M2, devido ao seu potencial anti-inflamatório. Estes ácidos graxos inibem a resposta inflamatória dependente do NF- $\kappa$ B em macrófagos, promovendo a resolução da inflamação, que irá desfavorecer a ativação de macrófagos M1 e estimular a polarização de macrófagos M2. Além disso, esses ácidos graxos podem controlar a ativação de macrófagos M2, por fatores de transcrição, como os PPAR [65].

O desequilíbrio da fase inflamatória tardia com o possível aumento de macrófagos M2 no tecido cicatricial dos camundongos transgênicos, pode ser justificado por mecanismos falhos nestas células.

A alteração genotípica de macrófagos M2 exibida pelos camundongos *FAT-1* pode estar associada à redução do gene CSF2. Este gene controla a produção, diferenciação e função dos granulócitos e macrófagos nos tecidos [66]. Pesquisas demonstraram que o CSF2 estimula a proliferação de macrófagos M2 e, que no tecido pulmonar, estes macrófagos quando ausentes do gene CSF2, contribuem para a patogênese pulmonar [67]. Isto comprova que o gene CSF2 é requerido para a manutenção da função anti-inflamatória destas células.

Paralelamente, vias anti-inflamatórias importantes para a ação destes tipos celulares, podem estar prejudicadas. Dentre as principais vias de controle da inflamação, destaca-se a via anti-inflamatória colinérgica. Esta via é capaz de atenuar a produção de citocinas pró-inflamatórias por células periféricas, onde existe uma lesão. Para ser ativada, sinais inflamatórios provenientes desta região lesionada, ativam o nervo vago, estimulando a

liberação de ACh, que se liga no receptor  $\alpha 7$ nAChR em células imunes, fazendo-as com que controlem a inflamação [68]. Foi demonstrado, que a ativação da  $\alpha 7$ nAChR promove a cicatrização de feridas em animais diabéticos, devido à redução de componentes inflamatórios tais como TNF- $\alpha$  [48]. Assim, a expressão aumentada da proteína  $\alpha 7$ nAChR pelo grupo *FAT-1*, indica que a via anti-inflamatória colinérgica está sendo ativada no ambiente extracelular.

Um dos mecanismos responsáveis pela propagação deste sinal anti-inflamatório mediado pelo receptor  $\alpha 7$ nAChR, é a ativação da via transdutora de sinal e ativadora de transcrição JAK2/STAT3. Estudos envolvendo doenças inflamatórias, demonstraram que a atenuação da doença ocorreu através da ativação da via de sinalização JAK2/STAT3 dependente da  $\alpha 7$ nAChR [69-70]. No presente estudo, observou-se expressão reduzida da proteína pSTAT3 pelos camundongos *FAT-1*. Outro grupo demonstrou, que o ácido graxo DHA da família  $\omega$ -3, diminuiu a fosforilação de STAT3, por aumentar a expressão da enzima SHP-1, envolvida com a regulação negativa desta fosforilação [71]. Estes dados comprovam que ácidos graxos  $\omega$ -3 podem modular a via JAK2/STAT3 e, que os camundongos *FAT-1* inibiram a via anti-inflamatória colinérgica, após ativação da  $\alpha 7$ nAChR, no meio intracelular, devido a redução de pSTAT3. Esta inibição, dificulta a resolução da inflamação, a qual prolonga-se sobre as demais fases do processo de cicatrização, modulando-as negativamente.

A MEC é uma estrutura altamente dinâmica e durante a cicatrização de feridas, as células interagem com moléculas da MEC, objetivando a formação de tecido novo [72]. Contudo, nossos resultados de PCR *array*, revelaram uma MEC comprometida. As integrinas são receptores de adesão à superfície celular, as quais atuam como mediadores da comunicação entre o citoesqueleto celular e a MEC, influenciando a migração e proliferação celular, como também a reepitelização e remodelamento do tecido [72]. Assim, a modulação negativa dos genes da família de integrinas pelos camundongos *FAT-1*, indica que todo este processo está prejudicado. Adicionalmente, a expressão reduzida dos genes HB-EGF, EGFR e também do Wnt5a, reforçam este prejuízo. O gene Wnt5a é necessário para controlar a proliferação e a migração das células [73], enquanto que o HB-EGF é membro da família do EGF, cujos efeitos mitogênicos e migratórios em queratinócitos e fibroblastos, promovem a reparação dérmica e a angiogênese. Em uma condição basal, os níveis de HB-EGF são normalmente baixos, ao contrário quando se tem uma lesão, na qual, níveis elevados de HB-EGF aceleram a reepitelização e o fechamento da ferida [74].

Além disso, a expressão elevada dos marcadores CD206 e CD280 pelo grupo *FAT-1*, indica uma degradação excessiva da MEC. Ambos os marcadores estão envolvidos com a internalização e degradação do colágeno [75]. A presença do colágeno a ser internalizado pela

célula e reciclado, resulta da ação das MMPs, que são enzimas responsáveis pela degradação temporária da MEC e, dos TIMPs que controlam sua ação [76]. O *turnover* correto do colágeno é crucial para a migração celular e reepitelização. Assim como uma deposição excessiva de colágeno pode favorecer a fibrose, a ausência de colágeno está associada a diversas doenças degenerativas [75]. Deste modo, a expressão aumentada de CD206 e CD280 associa-se à modulação positiva do gene MMP1a pelos camundongos transgênicos, sugerindo uma ligação entre a degradação da MEC desregulada, com consequente aumento da via de reciclagem do colágeno (CD206 e CD280) que está sendo produzido em excesso.

Até o momento, todos estes resultados sugerem que o não controle da fase inflamatória tardia do processo de cicatrização de feridas, pelos camundongos *FAT-1*, modulou genes necessários à formação e manutenção das funções da MEC, impactando no tempo de fechamento da ferida.

## 8. CONCLUSÃO

Camundongos *FAT-1*, capazes de produzir endogenamente ácidos graxos  $\omega$ -3 a partir de ácidos graxos  $\omega$ -6, apresentaram prejuízos no fechamento da ferida, em relação ao grupo controle WT.

O aumento da incorporação de ácidos graxos  $\omega$ -3 e consequente redução da proporção  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 no plasma e no tecido cicatricial dos camundongos *FAT-1*, amplificou a inflamação na fase inflamatória tardia do processo de cicatrização de feridas, dificultando a resolução desta fase, para que a próxima etapa do processo (formação de tecido/proliferação) ocorresse.

O perfil pró-inflamatório evidenciado, justifica-se pela redução da expressão proteica da pSTAT3, que impede a propagação do sinal anti-inflamatório, mediado pela via anti-inflamatória colinérgica.

Contudo, o desequilíbrio da resposta inflamatória, modulou a expressão de genes essenciais a formação e manutenção da MEC e consequente formação de tecido novo.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pereira RF e Bártolo PJ. *Traditional Therapies for Skin Wound Healing*. Advances in Wound Care (New Rochelle), 2016 May 1; 5(5): 208–229.
2. Landén NX.; et al. *Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016; 73(20): 3861–3885.
3. Krafts KP. *Tissue repair: the hidden drama*. Organogenesis, 2010; 6(4): 225-233.
4. Pyter LM.; et al. *Tumors Alter Inflammation and Impair Dermal Wound Healing in Female Mice*. PloS One, 2016; 11(8): e0161537.
5. Rittié L. *Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals*. Journal of Cell Communication and Signalling, 2016 Jun; 10(2): 103–120.
6. Landén NX.; Li D e Stahle M. *Transition from Inflammation to proliferation: a critical step during wound healing*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2016; 73(20): 3861–3885.
7. Eming SA.; Krieg T e Davidson JM. *Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms*. The Journal of investigative dermatology, 2007; 127(3): 514-525.
8. Raitz R. *Extracellular matrix role on the wound healing of oral lesions*. Revista do Instituto de Ciências da Saúde. 2008; 26(3): 351-6.
9. Barrientos S.; et al. *Growth factor and cytokines in wound healing*. Wound Repair and Regeneration, 2008; 16(5): 585-601.
10. Gonzalez ACO.; et al. *Wound healing – a literature review*. Anais Brasileiros de Dermatologia. 2016; 91(5): 614-20.
11. Dickinson LE e Gerecht S. *Engineered Biopolymeric Scaffolds for Chronic Wound Healing*. Frontiers in Physiology, 2016; 7: 341.
12. Dreifke MB.; et al. *Current wound healing procedures and potential care*. Materials Science & Engineering C, 2015 Mar; 48: 651–662.
13. Thangapazham RL.; et al. *Phytochemicals in Wound Healing*. Advances in Wound Care (New Rochelle), 2016 May 1; 5(5): 230–241.
14. Guo S e DiPietro LA. *Factors Affecting Wound Healing*. Journal of Dental Research, 2010 Mar; 89(3): 219–229.
15. Chow O e Barbul A. *Immunonutrition: Role in Wound Healing and Tissue Regeneration*. Advances in Wound Care (New Rochelle), 2014 Jan 1; 3(1): 46–53.
16. Vodovotz Y.; et al. *Translational Systems Approaches to the Biology of Inflammation and Healing*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2010 Jun; 32(2): 181–195.
17. Bradberry JC e Hilleman DE. *Overview of Omega-3 Fatty Acid Therapies*. Pharmacy and Therapeutics (P&T), 2013 Nov; 38(11): 681–691.

18. Watts JL. *Using Caenorhabditis elegans to Uncover Conserved Functions of Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids*. Journal of Clinical Medicine. 2016 Feb; 5(2): 19.
19. Rodrigues HG.; et al. *Oral administration of oleic or linoleic acid accelerates the inflammatory phase of wound healing*. The Journal of Investigative Dermatology, 2012; 132(1): 208-15.
20. Rodrigues HG.; et al. *Oral Administration of Linoleic Acid Induces New Vessel Formation and Improves Skin Wound Healing in Diabetic Rats*. Plos One, 2016; 11(10): e0165115.
21. Turk HF.; et al. *Inhibitory effects of omega-3 fatty acids on injury-induced epidermal growth factor receptor transactivation contribute to delayed wound healing*. American Journal of Physiology. Cell Physiology, 2013 May 1; 304(9): C905–C917.
22. McDaniel JC.; et al.  *$\omega$ -3 fatty acids effect on wound healing*. Wound Repair and Regeneration, 2008 May–Jun; 16(3): 337–345.
23. Arantes EL.; et al. *Topical Docosahexaenoic Acid (DHA) Accelerates Skin Wound Healing in Rats and Activates GPR120*. Biological Research for Nursing, 2016 Jan; vol 18.
24. Kang JX. *Fat-1 transgenic mice: A new model for omega-3 research*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2007; 77, 263–267.
25. Kang JX.; et al. *Fat-1 transgenic mice convert n-6 to n-3 fatty acids*. Nature, 2004; vol 427, 504.
26. Margaret JR.; et al. *Transgenic Increase in N-3/N-6 Fatty Acid Ratio Reduces Maternal Obesity-Associated Inflammation and Limits Adverse Developmental Programming in Mice*. Plos One, 2013; 8(6): e67791.
27. Shaonin Ji.; et al. *Transgenic Expression of n-3 Fatty Acid Desaturase (fat-1) in C57/BL6 Mice: Effects on Glucose Homeostasis and Body Weight*. Journal of Cellular Biochemistry, 2009 Jul 1; 107(4): 809–817.
28. Delpech JC.; et al. *Transgenic Increase in n-3/n-6 Fatty Acid Ratio Protects Against Cognitive Deficits Induced by an Immune Challenge through Decrease of Neuroinflammation*. Neuropsychopharmacology, 2015 Feb; 40(3): 525–536.
29. Kathryn E.; et al. *Brain omega-3 polyunsaturated fatty acids modulate microglia cell number and morphology in response to intracerebroventricular amyloid- $\beta$  1-40 in mice*. Journal of Neuroinflammation, 2016; 13: 257.
30. Bellenger J.; et al. *High Pancreatic n-3 Fatty Acids Prevent STZ-Induced Diabetes in Fat-1 Mice: Inflammatory Pathway Inhibition*. Diabetes, 2011 Apr; 60(4): 1090–1099.
31. Mohammed A.; et al. *Endogenous n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Delay Progression*

- of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Fat-1-p48<sup>Cre/+</sup>-LSL-Kras<sup>G12D/+</sup> Mice*. Neoplasia, 2012 Dec; 14(12): 1249–1259.
32. Hwang WM.; et al. *Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids May Attenuate Streptozotocin-Induced Pancreatic  $\beta$ -Cell Death via Autophagy Activation in Fat1 Transgenic Mice*. Endocrinology and Metabolism (Seoul), 2015 Dec; 30(4): 569–575.
  33. Kang X.; et al. *Inhibition of the HER2 pathway by n-3 polyunsaturated fatty acids prevents breast cancer in fat-1transgenic mice*. The Journal of Lipid Research, 2013 Dec; 54(12): 3453–3463.
  34. Weylandt KH.; et al. *Suppressed liver tumorigenesis in fat-1 mice with elevated omega-3 fatty acids is associated with increased omega-3 derived lipid mediators and reduced TNF- $\alpha$* . Carcinogenesis, 2011 Jun; 32(6): 897–903.
  35. Taguchi A.; et al. *Matrix Metalloproteinase (MMP)-9 in Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) Is Suppressed by Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids In Vitro and In Vivo*. Plos One, 2014; 9(2): e89605.
  36. Monk JM.; et al. *Th17 Cell Accumulation Is Decreased during Chronic Experimental Colitis by (n-3) PUFA in Fat-1 Mice*. The Journal of Nutrition, 2012 Jan; 142(1): 117–124.
  37. Cai A.; et al. *Metabolic enrichment of omega-3 polyunsaturated fatty acids does not reduce the onset of idiopathic knee osteoarthritis in mice*. Osteoarthritis Cartilage, 2014 Sep; 22(9): 1301–1309.
  38. Yanli Li.; et al. *Endogenous n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Attenuate T Cell-Mediated Hepatitis via Autophagy Activation*. Frontiers in Immunology, 2016; 7: 350.
  39. Tracey KJ. *The inflammatory reflex*. Nature, 2002; 420: 853–859.
  40. Olofsson PS.; et al. *Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity*. Immunological reviews, 2012; 248(1): 188–204.
  41. Matteoli G e Boeckxstaens GE. *The vagal innervation of the gut and immune homeostasis*. Gut, 2013 Ag; 62(8): 1214–22.
  42. Haiya Wu.; Ling Li e Xiao Su. *Vagus Nerve through  $\alpha 7$  nAChR Modulates Lung Infection and Inflammation: Models, Cells, and Signals*. Biomed Research International, 2014.
  43. Rodrigues HA., et al. *Reduced Expression of the Vesicular Acetylcholine Transporter and Neurotransmitter Content Affects Synaptic Vesicle Distribution and Shape in Mouse Neuromuscular Junction*. Plos One, 2013; v. 8, n. 11.
  44. Wang H.; et al. *Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation*. Nature, 2003; 421(6921): p.384–8.

45. Amenta F e Tayebati SK. *Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as targets for treatment of adult-onset cognitive dysfunction*. Current Medicinal Chemistry, 2008; 15(5): 488-98.
46. Curtis BJ e Radek KA. *Cholinergic regulation of keratinocyte innate immunity and permeability barrier integrity: new perspectives in epidermal immunity and disease*. The Journal of Investigative Dermatology, 2012 Jan; 132(1): 28–42.
47. Chatterjee PK.; et al. *Cholinergic agonists regulate JAK2/STAT3 signaling to suppress endothelial cell activation*. American Journal of Physiology. Cell Physiology, 2009 Nov; 297(5): C1294–C1306.
48. Dong MW.; et al. *Activation of  $\alpha 7$ nAChR Promotes Diabetic Wound Healing by Suppressing AGE-Induced TNF- $\alpha$  Production*. Inflammation, April 2016; Vol. 39, No. 2.
49. Luyer MD.; et al. *Nutritional stimulation of cholecystokinin receptors inhibits inflammation via the vagus nerve*. The Journal of experimental medicine, 2005; 202(8): p. 1023-9.
50. Fisk HL.; et al. *The use of gas chromatography to analyze compositional changes of fatty acids in rat liver tissue during pregnancy*. Journal of Visualized Experiments, 2014; 85, e51445.
51. Bradford MM. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976; 72: 248-54.
52. Kang JX. *Balance of Omega–6/Omega–3 Essential Fatty Acids Is Important for Health. The evidence from gene transfer studies*. World review of nutrition and dietetics, 2005; vol 95, p 93-102.
53. Lands B.; Bibus D e Stark KD. *Dynamic interactions of n-3 and n-6 fatty acid nutrients*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2017 Jan 25.
54. Liu M.; et al. *Elevation of n-3/n-6 PUFAs ratio suppresses mTORC1 and prevents colorectal carcinogenesis associated with APC mutation*. Oncotarget, 2016 Nov 22; 7(47): 76944-76954.
55. Lee Y.; et al. *Analysis of endogenous lipids during intestinal wound healing*. Plos One, 2017; 12(8): e0183028.
56. Dhall S.; et al. *Arachidonic acid-derived signalling lipids and functions in impaired healing*. Wound Repair and Regeneration, 2015; 23(5): 644-656.
57. Nomura T.; et al. *Lipid analysis of normal dermis and hypertrophic scars*. Wound Repair and Regeneration, 2007; 15(6): 833-7.



58. Slater TW.; et al. *Neutrophil Microparticles Deliver Active Myeloperoxidase to Injured Mucosa To Inhibit Epithelial Wound Healing*. The Journal of Immunology, 2017; 198(7): 2886-2897.
59. Hristodorov D.; et al. *Targeting CD64 mediates elimination of M1 but not M2 macrophages in vitro and in cutaneous inflammation in mice and patient biopsies*. Mabs, 2015 Sep-Oct; 7(5): 853–862.
60. Dong-Soon Im. *Functions of omega-3 fatty acids and FFA4 (GPR120) in macrophages*. European Journal of Pharmacology, 2016; 785:36–43.
61. Ferrante CJ e Leibovich SJ. *Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing*. Advances in Wound Care, 2012.
62. Armstrong DA.; et al. *Neutrophil chemoattractant genes KC and MIP-2 are expressed in different cell populations at sites of surgical injury*. Journal of Leukocyte Biology, 2004; 75(4): 641-8.
63. Stanley AC.; et al. *Recycling endosome-dependent and -independent mechanisms for IL-10 secretion in LPS-activated macrophages*. Journal of Leukocyte Biology, 2012; 92: 1227–39.
64. Montenegro-Burke JR.; et al. *Lipid profiling of polarized human monocyte-derived macrophages*. Prostaglandins and other Lipid Mediators, 2016.
65. Röszer T. *Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms*. Mediators of Inflammation, 2015.
66. Watari K.; et al. *Impaired differentiation of macrophage lineage cells attenuates bone remodeling and inflammatory angiogenesis in Ndr1 deficient mice*. Scientific Reports, 2016; 6: 19470.
67. Lavin Y e Merad M. *Macrophages: Gatekeepers of Tissue Integrity*. Cancer immunology research, 2013 Oct; 1(4): 201–209.
68. Pavlov VA e Tracey KJ. *The vagus nerve and the inflammatory relex-linking immunity and metabolism*. Nature Reviews Endocrinology, 2012; 8(12): 743-754.
69. Jonge WJ e Ulloa L. *The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation*. British Journal of Pharmacology, 2007; 151, 915–929.
70. Xu ZQ.; et al. *Combined administration of anisodamine and neostigmine rescued acute lethal crush syndrome through  $\alpha 7$ nAChR-dependent JAK2-STAT3 signaling*. Scientific Reports, 2016; 6: 37709.
71. Xiong A.; et al. *Elimination of ALDH+ breast tumor initiating cells by docosahexanoic acid and/or gamma tocotrienol through SHP-1 inhibition of Stat3 signaling*. Molecular

carcinogenesis, 2016; 55(5): 420-30.

**72.** Koivisto L.; et al. *Integrins in Wound Healing*. Advances in Wound Care, 2014; 3(12): 762–783.

**73.** Houschyar KS.; et al. *Wnt signaling induces epithelial differentiation during cutaneous wound healing*. Organogenesis, 2015; 11(3): 95–104.

**74.** Johnson NR e Wang Y. *Controlled Delivery of Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor Yields Fast and Comprehensive Wound Healing*. Journal of Controlled Release, 2013; 166(2): 124–129.

**75.** Madsen DH.; et al. *M2-like macrophages are responsible for collagen degradation through a mannose receptor-mediated pathway*. The Journal of cell biology, 2013; 202(6): 951–966.

**76.** Stevens LJ e Page-McCaw A. *A secreted MMP is required for reepithelialization during wound healing*. Molecular Biology of the Cell, 2012; 23(6): 1068–1079.

## 10. ANEXOS

### 10.1. Comitê de ética



#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Cicatrização de feridas em camundongos FAT-1: envolvimento da via anti-inflamatória colinérgica, registrada com o nº 4175-1, sob a responsabilidade de Profa. Dra. Hosana Gomes Rodrigues e Thamiris Candreva, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em 11 de abril de 2016.

Finalidade:	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	05/2016-04/2018
Vigência da autorização para manipulação animal:	05/2016-04/2018
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	40
Peso / Idade:	02 meses / 25g
Sexo:	machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / FAT-1
No. de animais:	40
Peso / Idade:	02 meses / 25g
Sexo:	machos
Origem:	ICB/USP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 11 de abril de 2016.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva

**IMPORTANTE:** Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

## 10.2. Carta de submissão de artigo científico



### Authorship approval request for Hosana Rodrigues

The manuscript "Constitutive omega-3 fatty acid production in FAT-1 mice suppresses STAT3 phosphorylation and delays wound healing" (our reference 97486-INS-RG-1) has been submitted to the JCI Insight. Hosana Rodrigues has added you as an author of the submission and requests that you confirm authorship.

#### Submission files

- **Submission PDF:** [97486-INS-RG-1\\_ms\\_272578.pdf](#) (3.69 MB) uploaded Sep 13, 2017

[Download all files in a .zip package](#)

#### Authors

1. Thamiris Candreva (School of Applied Sciences/UNICAMP)
2. Carolina Kuhl (School of Applied Sciences/UNICAMP)
3. Beatriz Burger (School of Applied Sciences/UNICAMP)
4. Mariah dos Anjos (School of Applied Sciences/UNICAMP)
5. Suleyma Costa (School of Applied Sciences/UNICAMP)
6. Marcio Torsoni (School of Applied Sciences/UNICAMP)
7. Amanda Crisma (University of São Paulo)
8. Helena Fisk (Faculty of Medicine, University of Southampton)
9. Phillip Calder (University of Southampton)
10. Marco Aurélio Vinolo (Institute of Biology/UNICAMP)
11. Rui Curi (University of Sao Paulo)
12. Hosana Rodrigues (University of Campinas (UNICAMP))

#### Abstract

Wound healing is a physiological process classically divided into three overlapping phases: inflammation, proliferation and maturation. Since inflammation is the first phase of tissue repair, modulation of this response impacts the next phases, and influences the entire process. Omega-3 ( $\omega$ -3) fatty acids are known for their protective effects in inflammatory diseases; however, there is no consensus about their effects on wound healing. To understand the role of these fatty acids in the inflammatory phase of tissue repair, we used FAT-1 transgenic mice, capable of producing endogenous  $\omega$ -3 fatty acids from  $\omega$ -6 fatty acids provided in the diet. FAT-1 mice had higher levels of  $\omega$ -3, and lower levels of  $\omega$ -6 fatty acids in the phosphatidylcholine (PC) lipid fraction in skin, indicating that FAT-1 mice are a good model to study the effects of  $\omega$ -3 fatty acids on wound healing. Our results demonstrated an impaired wound closure and an increase in myeloperoxidase activity (MPO) in FAT-1 mice in comparison to wild-type (WT) mice. Through real-time PCR, we observed an increased expression of CD206 and CD280 mRNA in FAT-1 mice. In addition, FAT-1 mice had higher concentrations of pro-inflammatory mediators, such as IL-6, CXCL1, CXCL2, TIMP-1 and VEGF, and lower concentrations of IL-10, in wound tissue. To verify this inflammatory profile at the wound site, we analyzed the cholinergic anti-inflammatory pathway activation, which is a neuroimmunological system necessary for inflammation control. FAT-1 mice had increased expression of  $\alpha$ 7 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor ( $\alpha$ 7nAChR) and reduced phosphorylated STAT3 (pSTAT3), indicating impairment of the propagation of the anti-inflammatory signal. In conclusion, we hypothesize that high concentrations of omega-3 fatty acids, seen in FAT-1 mice, impair wound healing by the suppression of inflammation control pathways, prolonging the inflammatory phase and delaying the beginning of next phases and, consequently, the correct formation of new tissue.